Ribonukleoproteinpartikel aus Kernen primärer Spermatocyten von

Drosophila hydei:

Charakterisierung der RNA und ihre Beziehung zu den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elisabeth Knust

aus Leverkusen

Düsseldorf 1979

Ribonukleoproteinpartikel aus Kernen primärer Spermatocyten von *Drosophila hydei*: Charakterisierung der RNA und ihre Beziehung zu den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen

Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elisabeth Knust

aus Leverkusen

Düsseldorf

1979

UNIV. LIBRARY

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
1. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Geräte; Abkürzungen	4
2. Aufzucht der Larven und genetische Konstitution der Fliegenstämme	6
3. Isolierung der larvalen Hodenanlagen	6
4. Organkultur und radioaktive Markierung	7
5. Isolation von Spermatocytenkernen und Reinheitskriterien	7
5.1. Isolation von Spermatocytenkernen	7
5.2. Reinheitskriterien	8
5.2.1. Lichtmikroskopische Untersuchung	8
5.2.2. Malat-Dehydrogenase-Test	8
5.2.3. Vergleich der RNA in Spermatocytenkernen und Gesamthodenanlagen	8
6. Isolation von Kern-RNPs	9
6.1. RNP-Isolation und -Auftrennung auf Saccharose-Gradienten	9
6.2. Untersuchung des RNP-Pellets in Gegenwart von RNase T_1	9
6.3. Abschätzung von Sedimentationskoeffizienten	9
7. Ribosomen-Isolation	10
8. RNA-Isolation, -Reinigung und -Auftrennung	1
8.1. RNA-Isolation aus RNPs	10
8.2. RNA-Reinigung über CsCl	11
8.3. Isolation von pol (A)-haltiger RNA	11
8.4. Isolation von ribosomaler RNA	12
8.5. Auftrennung der RNA auf exponentiellen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelgradienten	12

UNIV. LEIDEN BIBL.

Seite

8.6. Auswertung der Elektrophoresen 13
9. Proteinisolation und -Auftrennung 14
10. Elektronenmikroskopische Untersuchung des RNP-PP 14
11. Filterhybridisierung der RNP-PP-RNA 15
11.1. DNA-Isolation 15
11.2. Filterhybridisierung 16
12. cDNA-Synthese 17
13. In-situ Hybridisierungen 17
13.1. Anfertigung von Spermatocytenkern-Präparaten 17
13.2. Präparation von polytänen Chromosomen 18
13.3. Durchführung der in-situ Hybridisierungen 18
13.4. Autoradiographie 19
III. Ergebnisse 21
1. Kernisolation 21
1.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der Kernfraktion 21
1.2. Bestimmung der Ausbeute 23
1.3. Malat-Dehydrogenase-Test 23
1.4. Vergleich der RNA in Spermatocytenkernen und Gesamthodenanlagen 24
2. Fraktionierung der larvalen Hodenanlagen 26
3. Die RNA des "Cytoplasmas" 26
4. RNP-Isolation 28
4.1. Die Untersuchung des RNP-Überstands 29
4.1.1. Die RNA des RNP-Überstands 3o
4.1.2. Die Proteine des RNP-Überstands 34
4.2. Untersuchung des RNP-Pellets 36
4.2.1. Die RNA des RNP-Pellets 38
4.2.2. Die Proteine des RNP-Pellets 4o

Seite

4.3. Untersuchung des RNP-PP 41

4.3.1. Die RNA des RNP-PP 41

4.3.2. Die Proteine des RNP-PP 45

4.3.3. Isolation des RNP-PP nach Behandlung des RNP-Pellets mit RNase T_1 45

4.3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung des RNP-PP 48

5. Filterhybridisierung der RNP-PP-RNA 52

6. In-situ Hybridisierungen 55

6.1. cDNA-Synthese 55

6.2. In-situ Hybridisierungen mit 38 S-cDNA 57

6.3. In-situ Hybridisierungen mit RNP-PP-cDNA 58

IV. Diskussion 61

V . Zusammenfassung 71

VI. Literaturverzeichnis 73

VII. Anmerkungen 8o

VIII. Lebenslauf 81

I. Einleitung

Lampenbürstenchromosomen sind eine besondere Form physiologisch aktiver Chromosomen in der ersten meiotischen Prophase vieler Tierarten (Zusammenfassung Hess, 1971), deren Struktur von Callan et al. (1963) an Amphibienoocyten ausführlich beschrieben wurde: sie bestehen aus einer DNA-Achse, die von einer Matrix, gebildet aus RNA und Protein, umgeben ist. Die Schleifen, in denen etwa 5 % der gesamten DNA einer Zelle vorkommen, stellen einen Ort starker RNA-Synthese dar.

Im Aufbau vergleichbare Strukturen wurden in den Kernen primärer Spermatocyten aller bisher untersuchten Drosophila-Arten gefunden (Hess und Meyer, 1963) und nach enzymatischen und histochemischen Untersuchungsergebnissen als Lampenbürstenschleifen gedeutet (Meyer, 1963; Hennig, 1967). Diese werden von Schleifenbildungsorten auf dem Y-Chromosom ausgespult und bilden besonders bei Drosophila hydei lichtmikroskopisch gut erkennbare, morphologisch unterscheidbare Strukturen (Hess und Meyer, 1968). Für diese Art konnten die Schleifenbildungsorte der fünf besonders großen Schleifenpaare durch cytogenetische Experimente auf dem Y-Chromosom lokalisiert werden (Hess, 1965), und zwar befinden sich die Schleifenbildungsorte für die Schlingen (S) auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms, die Loci für Keulen (K) und Tubulibänder (T) im proximalen Abschnitt des langen Arms und die Orte für den Pseudonukleolus (P) mit den Zapfen (Z) und für die Fäden (F) am distalen Ende des langen Arms (Abb.1).

Männchen mit einer Defizienz in einem oder mehreren Schleifenbildungsorten auf dem Y-Chromosom oder mit blockierter Schleifenausfaltung bilden keine fertilen Spermien (Hess, 1968; Hess und Meyer, 1968; Meyer, 1968), was hauptsächlich auf eine Desorganisation, und nicht auf das Fehlen bestimmter, für die Bildung der Spermien notwendiger Organellen, zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund kann eine Codierung von Strukturproteinen für die Spermienorganellen an den Schleifen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Der autoradiographische Nachweis einer Inkorporation von Tritium-markiertem Uridin in die Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms

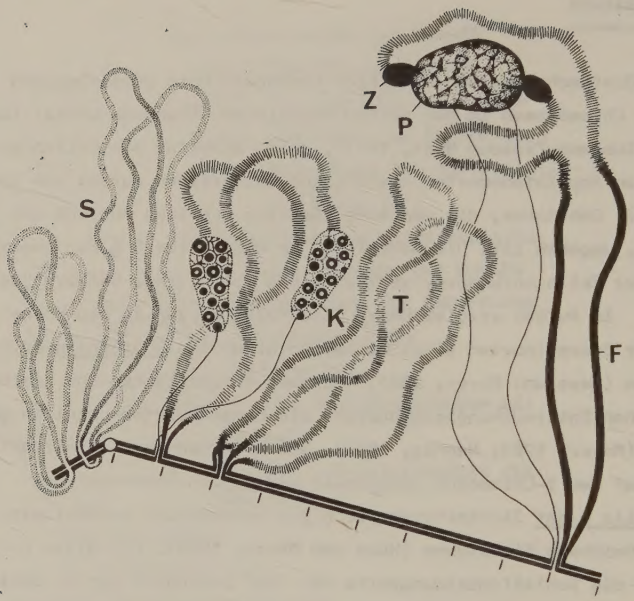


Abbildung 1 : Schema des Y-Chromosoms von D.hydei während der Lampenbürstenphase mit den Schleifenbildungsorten (Erklärung s.Text). Das Schema wurde freundlicherweise von Prof.Dr.O.Hess zur Verfügung gestellt.

(Hennig, 1967) und die Empfindlichkeit dieser Strukturen gegenüber einer RNA-Synthese-Hemmung durch Actinomycin D (Meyer und Hess, 1965) wurde, analog zu den Untersuchungsergebnissen an Triturus-Lampenbürstenschleifen, als Beweis für die Transkriptionsaktivität des Y-Chromosoms angesehen.
Auf das Vorhandensein Y-codierter RNA lassen Ergebnisse von Hennig (1967) und Schwochau (pers.Mitt.) schließen, doch konnte bis heute keine derartige RNA isoliert und charakterisiert werden.
Da nach Beendigung der Meiose keine RNA-Synthese mehr nachweisbar ist (Olivieri und Olivieri, 1965; Hennig, 1967; Lassak et al., 1979), jedoch eine sehr starke postmeiotische Proteinsynthese

stattfindet (Hennig, 1967), müssen die für die Translation post-meiotischer Proteine benötigten mRNAs prämeiotisch transkribiert und, z.B. in Form von RNPs, gespeichert werden. Ein anschließender Verteilungsmechanismus muß dann eine gleichmäßige Aufteilung dieser RNPs auf die entstehenden Spermatiden gewährleisten.

Die Faktoren, die einen geordneten Ablauf der Spermiogenese kontrollieren, müssen während der Lampenbürstenphase wirksam sein, denn in den folgenden meiotischen Teilungen segregieren X- und Y-Chromosomen und auch Spermatiden ohne Y-Chromosom entwickeln sich zu fertilen Spermien.

Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß in den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen die Faktoren zu suchen sind, die die spätere Spermiendifferenzierung kontrollieren, so daß durch die Analyse dieser Strukturen Aufschlüsse über ihre Funktion in der Spermiogenese gewonnen werden könnten.

Ausgehend von dem Befund, daß die Schleifenmatrix aus Ribonukleoproteinpartikeln besteht (Hennig, 1967), wurde diese Arbeit mit dem Ziel durchgeführt, durch Auftrennung von Spermatocytenkern-RNPs Material der Lampenbürstenschleifenmatrix in einer RNP-Fraktion anzureichern.

Anschließende Untersuchungen sollten dann weitere Informationen über Struktur und Funktion der RNA dieser Partikel geben und damit zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der Spermiogenese von Drosophila hydei auf molekularer Ebene beitragen.

II. Material und Methoden

1. Verzeichnis der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Geräte; Abkürzungen

Acrylamid: Merck, Darmstadt

Bisacrylamid: Serva, Heidelberg

Brij-35: Serva, Heidelberg

Formamid: Merck, Darmstadt; 1oo ml Formamid wurden mit 2 g Amberlite MB 1 Ionenaustauschharz (Serva, Heidelberg) deionisiert.

Gardol: Sigma Chemie, München

Heparin: Serva, Heidelberg

Nonidet P-4o: Fluka Chemie, Buchs

oligo $d(pT)_{12-18}$: Boehringer, Mannheim

poly(U)-Sepharose 4 B: Pharmacia, Uppsala

Radiochemikalien: 5-^{3}H-Uridin (26 Ci/mmol); ^{14}C(U)-Uridin (464 mCi/mmol); 4,5-^{3}H(N) L-Leucin (4o Ci/mmol); 4,4-^{3}H(N)L-Lysin (6o Ci/mmol); 2,3-^{3}H L-Arginin (3o Ci/mmol); 5-^{3}H Desoxycytidin 5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz (22,1 Ci/mmol); 8-^{3}H(N) Desoxyadenosin 5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz (15 Ci/mmol); 8-^{3}H Desoxyguanosin 5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz (12 Ci/mmol); Methyl-^{3}H Desoxythymidin 5'-Triphosphat, Tetranatriumsalz (62,9 Ci/mmol). Alle von NEN, Dreieich.

Saccharose: ultra pure, RNase-frei; Schwarz/Mann, Heidelberg

Sephadex G-75: Pharmacia, Uppsala

Silikonisierungslösung: 5 % Dimethyldichlorsilan in Benzol

Spermin: Serva, Heidelberg

Szintillationschemikalien: Monophase-4o, Carbo-Sorb, Permafluor, Instagel II; alle von Packard Instr., Frankfurt

Proteinase K: Merck, Darmstadt; die Proteinase K-Lösung wurde vor Gebrauch eine Stunde bei 37 °C vorinkubiert.

RNase A: Boehringer, Mannheim. Die RNase-Lösung wurde vor Gebrauch 1o Minuten bei 8o °C erhitzt.

RNase T_1: Boehringer, Mannheim

Kühlzentrifuge: Sorvall RC 2B, HB-4 Rotor

präparative Ultrazentrifuge: Beckman L5-65 und L5-75

Szintillationszähler: Packard Tri-Carb Flüssigkeitsszintillationszähler Modell 338o mit angeschlossenem Absoluten Aktivitätsanalysator 544 oder Modell 265o

Fraktionenkollektor: ISCO-Gradientenfraktionator 64o. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 254 nm mit dem ISCO UA-5 Monitor

Probenverbrennungsautomat: Packard 3o6

Bis: N,N'-Methylenbisacrylamid

Brij-35: Polyäthylenglykolmonolauryläther

DNA: Desoxyribonukleinsäure

cDNA:komplementäre DNA

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

Gardol: Natrium-N-lauroyl-sarkosinat

NADH: reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid

RNA: Ribonukleinsäure

mRNA: Messenger-RNA; hnRNA: heterogene nukleäre RNA; rRNA: ribosomale RNA; tRNA: Transfer-RNA.

RNP: Ribonukleoprotein

rpm: Rotorumdrehungen pro Minute

SDS: Natriumdodecylsulfat

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TCA: Trichloressigsäure

2. Aufzucht der Larven und genetische Konstitution der Fliegenstämme

Die Versuche wurden an Drosophila hydei durchgeführt. Die Larven wurden auf einem Standardfutterbrei aus Maisgries, Zuckerrübensirup, Malzextrakt, Sojamehl, Trockenbierhefe, Agar und Wasser (Hess, 1976) bei einer konstanten Temperatur von 23 °C aufgezogen. Um die Larvenpopulation zu synchronisieren, wurden 1o–25 Tage alte Elterntiere für 2o–24 Stunden zur Eiablage auf den Brei gesetzt. Die Larven befanden sich dann nach 8–1o Tagen im dritten Larvenstadium.

Der größte Teil der Versuche wurde mit einem Wildstamm (+) von Drosophila hydei durchgeführt, der seit 1961 im Institut gehalten wird.

Daneben wurden Männchen ohne Y-Chromosom (X/O) verwendet, die nach einer Methode von Beck(1976)und Schäfer (1978) gewonnen wurden:XX/O-Weibchen wurden mit Wildtyp (X/Y)-Männchen gekreuzt: alle F_1-Männchen zeigen den X/O-Genotyp.

Außerdem wurde der Stamm 7o3/33 (XX/Y x X-3/Y/Y) aus den Zuchten von Professor Dr.O.Hess verwendet. Die Männchen dieses Stammes tragen eine X-Autosomen-Translokation (T(X-3)), wobei der größte Teil des heterochromatischen Arms des X-Chromosoms fehlt. Außerdem besitzen sie zwei vollständige Y-Chromosomen.

3. Isolierung der larvalen Hodenanlagen

Larven des dritten Larvenstadiums wurden in einer 2o–25 %igen Zuckerlösung vom Futterbrei getrennt (Mead, 1964).

Die Massenisolation der Hodenanlagen erfolgte in Anlehnung an die von Boyd et al. (1968) für Speicheldrüsen beschriebene Methode, wobei der letzte Schritt – Reinigung der Organe im Ficoll-Gradienten – ausgelassen wurde (Schwochau, pers.Mitt.). Die Hodenanlagen wurden unter dem Binokular aus Drosophila-Ringer (o.184 M KCl, o.o46 M NaCl, o.oo3 M $CaCl_2$, o.o1 M Tris/HCl,pH 7.2) mit einer Pinzette direkt in ein Blockschälchen mit Inkubationsmedium gesammelt.

4. Organkultur und radioaktive Markierung

Die Hodenanlagen (1ooo–2ooo pro Versuch) wurden in ca. o.5 ml Schneider's Drosophila Medium (Grand Island Biol. Comp.) inkubiert, dem Rifampicin in einer Konzentration von 1o µg/ml (Schwochau, pers. Mitt.) zugegeben war. Die radioaktiven Vorstufen (25–75 µCi/Inkubationsansatz) wurden vorher im Blockschälchen eingedampft. Die Markierung der RNA erfolgte mit ^{3}H– oder ^{14}C–Uridin. Zur Markierung der Proteine wurde ein Mangelmedium nach Schneider (1966) hergestellt, in dem die Aminosäuren fehlten, die als radioaktive Vorstufen zugegeben wurden, nämlich ^{3}H–Leucin, –Lysin und –Arginin.
Die Hodenanlagen wurden in einem Blockschälchen, das mit einem Glasdeckel versehen war, in einer feuchten Kammer bei 22 °C im Dunkeln für 2o–24 Stunden inkubiert.
Beim Vergleich der RNA–Synthese in den Hodenanlagen zweier verschiedener Genotypen wurden Doppelmarkierungsexperimente durchgeführt: dann erfolgte die Inkubation der Hodenanlagen parallel in zwei verschiedenen Blockschälchen, wobei sich die verwendeten Vorstufen nur in der Art ihrer Markierung (^{3}H oder ^{14}C) unterschieden. Alle folgenden Versuchsschritte wurden gemeinsam durchgeführt, wobei Abweichungen im Ergebnis, die durch unterschiedliche Aufarbeitung des Materials hervorgerufen würden, ausgeschlossen werden konnten.

5. Isolation von Spermatocytenkernen und Reinheitskriterien

5.1. Isolation von Spermatocytenkernen

Zur Isolation von Spermatocytenkernen wurde eine Methode von Boyd et al. (1968) zur Isolation von Speicheldrüsenkernen abgewandelt: Die Hodenanlagen wurden nach Beendigung der Inkubation mehrfach mit insgesamt ca. 1o ml Drosophila–Ringer gespült und in einen 1 ml–Dounce Homogenisator überführt. Der Drosophila–Ringer wurde vollständig abgesaugt und die Hodenanlagen in o.7 ml Kernisolationspuffer (o.11 M NaCl, o.oo19 M KCl, o.oo25 M $MgCl_2$, o.5 % (w/w) Nonidet P–4o, o.oo1 % (w/w) Spermin, o.o1 M Tris/HCl, pH 7.2) mit drei Stößen des schwergängigen Pistills homogenisiert, durch eine Gaze mit 69 µm Maschenweite filtriert und im Eppendorf–Gefäß für 1.5 min bei 1ooo rpm zentrifugiert.

Der Überstand (im Folgenden stets "Cytoplasma" genannt) wurde vorsichtig abgesaugt und die im Sediment befindlichen Kerne weiterverarbeitet.

5.2. Reinheitskriterien

Um die Reinheit der gewonnen Kernfraktion zu überprüfen, wurden drei Kontrollen durchgeführt:

5.2.1. Lichtmikroskopische Untersuchung

Die Anzahl der Zellkerne wurde in einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Spermatocytenkernpräparation wurde im Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Photomikroskop II) photographiert (Agfapan-100 Film).

5.2.2. Malat-Dehydrogenase-Test

Hierzu wurden die Kerne aus 500 Hodenanlagen in 0.2 ml TRA-Puffer (0.05 M Triäthanolamin, pH 7.5) aufgenommen und 50 µl davon mit 2.0 ml TRA-Puffer und 0.03 ml 0.01 M NADH (in TRA-Puffer) in eine 1 ml-Küvette des Beckman DBGT-Photometers gegeben. Nach Zugabe von 0.05 ml Oxalacetat (0.4 M in TRA-Puffer, pH 7.0) wurde die Absorptionszunahme bei 366 nm gegen eine Kontrollküvette, die 2.1 ml TRA-Puffer und 0.03 ml NADH enthielt, über einen Zeitraum von 8 min ermittelt. Zur Bestimmung der cytoplasmatischen Enzymaktivität wurde das "Cytoplasma" auf 2.4 ml mit TRA-Puffer aufgefüllt und von dieser Suspension 50 µl zur Messung der Enzymaktivität eingesetzt, die wie bei den Kernen beschrieben durchgeführt wurde.
Die Absorptionszunahme pro Minute und ml Lösung ist ein Maß für die Enzymaktivität, deren Größe in der Kernfraktion Aufschluß über den Anteil cytoplasmatischer Kontamination gibt(Bergmeyer, 1970).

5.2.3. Vergleich der RNA in Spermatocytenkernen und Gesamthodenanlagen

Hierzu wurden Hodenanlagen 24 Stunden mit radioaktiv-markiertem Uridin inkubiert, die RNA aus Spermatocytenkernen (^{3}H-markiert) und Gesamthodenanlagen (^{14}C-markiert) isoliert (s. Kapitel 8.1.) und in Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

6. Isolation von Kern-RNPs

6.1. RNP-Isolation und -Auftrennung in Saccharose-Gradienten

Die pelletierten Spermatocytenkerne wurden in o.5 ml RNP-Isolationspuffer $C_{1o,Isol.}$ (o.o1 M Tris/HCl, pH 7.o , o.o1 M NaCl, o.o1 M $MgCl_2$, 2 mg/ml Heparin, o.oo5 M Mercaptoäthanol) suspendiert, in einem 1 ml-Dounce-Homogenisator mit 12 Stößen des schwergängigen Pistills homogenisiert und im Eppendorf-Gefäß bei 1o ooo rpm für 2o min zentrifugiert. Das Pellet (= RNP-P) wurde, wenn nicht anders beschrieben, in o.5 ml Isolationspuffer $C_{1o,Isol.}$ mit drei Stößen des schwergängigen Pistills homogenisiert und, genau wie der Überstand (= RNP-Ü), in 5-5o %igen linearen Saccharose-Gradienten (in Lösung C_{1o}: o.o1 M NaCl, o.o1 M $MgCl_2$, o.o1 M Tris/HCl, pH 7.o) im SW 4o Ti Rotor für 15 Stunden bei 0 °C und 3o ooo rpm zentrifugiert.
Die Gradienten wurden im ISCO-Gradientenanalysator fraktioniert und die Absorption bei 254 nm vermessen. Um die Verteilung der Radioaktivität im Gradienten zu ermitteln, wurde aus jeder Fraktion ein Aliquot entnommen und in Monophase/H_2O (1o/1) im Szintillationszähler gezählt.
Außer den RNP-Fraktionen im Gradienten wurde das Material, das vom RNP-P auf den Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentierte (= RNP-PP) weiter untersucht.

6.2. Untersuchung des RNP-Pellets in Gegenwart von RNase T_1

Hierzu wurde das RNP-Pellet, wie in Abschnitt 6.1. beschrieben isoliert und der RNP-Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das RNP-Pellet in o.5 ml o.5 M Tris/HCl, pH 7.4, o.o1 M EDTA aufgenommen, mit drei Stößen des schwergängigen Pistills homogenisiert und mit RNase T_1 (Endkonzentration 4 µg/ml) 3o min bei 25 °C inkubiert.
Die Auftrennung der RNPs erfolgte wie in 6.1. beschrieben.

6.3. Abschätzung von Sedimentationskoeffizienten

Die Abschätzung der Sedimentationskoeffizienten wurde mit Hilfe der McEwen-Tabellen durchgeführt (McEwen, 1967). Dabei wurde eine Dichte von 1.6 g/cm^3 für die RNPs angenommen.

7. Ribosomen-Isolation

Die Isolation von Ribosomen aus larvalen Hodenanlagen erfolgte in Anlehnung an Methoden von Boshes (197o) und Steffenson (1973). Hierzu wurden die in Schneider's Medium inkubierten Hodenanlagen mehrfach mit Drosophila-Ringer gespült, im 1 ml-Dounce Homogenisato in o.5 ml Ribosomen-Dissoziationspuffer (o.5 M KCl, o.oo1 M $MgCl_2$, o.o5 M Tris/HCl, pH 7.6) + o.25 M Saccharose, 1 % (w/w) Triton X-1o o.oo5 M Mercaptoäthanol mit 5 Stößen des schwergängigen Pistills homogenisiert und für 3o min bei 1o ooo rpm und $0^{o}C$ im Eppendorf-gefäß zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine 3o %ige (w/w) Saccharose-Stufe (in Ribosomen-Dissoziationspuffer)gegeben und im SW 6o Rotor bei 5o ooo rpm und 0 ^{o}C für 8 Stunden zentrifugiert (od im SW 4o Ti Rotor bei 4o ooo rpm und 5 ^{o}C für 15 Std.).
Das so gereinigte Ribosomen-Pellet wurde in o.2 ml Ribosomen-Dissoziationspuffer aufgenommen und die ribosomalen Untereinheiten durch Zentrifugation (4o ooo rpm, 5 ^{o}C, 6 Std.) in einem 15-45 %igem (w/w) Saccharose-Gradienten (in Ribosomen-Dissoziationspuffer) aufgetrennt.
Fraktionierung und Absorptionsmessung erfolgte im ISCO-System.
Die Fraktionen, die die ribosomalen Untereinheiten enthielten, wurd vereinigt und für die RNA- oder Proteinisolation weiterverarbeitet.

8. RNA-Isolation, -Reinigung und -Auftrennung

8.1. RNA-Isolation

Pelletierte RNPs wurden in 1 ml o.o1 M Tris/HCl, pH7.4 , o.5 % (w/ SDS, 1oo µg/ml Proteinase K resuspendiert und eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.
RNP-Fraktionen aus Saccharose-Gradienten wurden auf eine Endkonzentration von o.5 % (w/w) SDS und 1oo µg/ml Proteinase K gebracht. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Zimmertemperatur.
Durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung und zweieinhalbfachem Volumen 96 %igen Äthanol wurde die RNA bei -2o ^{o}C für mindestens 12 Stunden gefällt.

8.2. RNA-Reinigung über CsCl

Für die Filterhybridisierungen wurde die RNP-PP-RNA über einen CsCl-Gradienten gereinigt, um Proteinreste, Proteinase und DNA zu entfernen (Glisin, 1974).
Hierzu wurde die pelletierte RNA in einer Tris/Gardol-Lösung (0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 , 4 % (w/w) Gardol) aufgenommen, pro ml RNA-Lösung 1 g festes CsCl zugegeben und auf 1 ml eines CsCl-Kissens (0.1 M EDTA, $\varrho = 1.71\ g/cm^3$) geschichtet.
Die Zentrifugation erfolgte im SW 60 Rotor bei 20 ^{o}C und 35 000 rpm für 15 Std. Anschließend wurde die CsCl-Lösung bis auf 0.5 ml abgesaugt, das RNA-Pellet mit H_2O vom Röhrchenboden gelöst und die RNA erneut mit NaCl und Äthanol gefällt.

8.3. Isolation poly(A)-haltiger RNA

Die Isolation poly(A)-haltiger RNA erfolgte nach den Angaben von Nellen (pers.Mitt.).
Poly(U)-Sepharose (0.1 g/Säule) wurde in 4 ml TES/NaCl (0.01 M EDTA, 0.1 M NaCl, 0.5 % (w/w) SDS, 0.01 M Tris/HCl, pH 7.4) aufgenommen, in eine unten mit Glaswolle verschlossene Pasteur-Pipette gefüllt und mit 4 ml TES/NaCl gespült.
Die RNA wurde 30 min bei 13 000 rpm pelletiert und in 2 ml TES/NaCl gelöst. Nach dreiminütigem Erhitzen (80 ^{o}C) wurde sie zweimal über die Säule gegeben. Die nicht gebundene RNA (= poly(A)$^-$-RNA) wurde durch Zugabe von NaCl und Äthanol gefällt. Die Ablösung der an die poly(U)-Sepharose-Säule gebundenen RNA (= poly(A)$^+$-RNA) erfolgte mit 2 ml TES/Formamid (0.01 M EDTA, 0.5 % (w/w) SDS, 50 % (w/v) Formamid, 0.01 M Tris/HCl, pH 7.4), das eine Temperatur von 50 ^{o}C hatte, oder mit 2 ml H_2O (50 ^{o}C). Die Fällung der RNA wurde wie oben beschrieben durchgeführt.
Bei Elution der poly(A)-haltigen RNA mit H_2O konnte die Säule, nachdem sie mit TES/NaCl equilibriert war, noch mehrfach benutzt werden.

8.4. Isolation von ribosomaler RNA

Hierzu wurden die larvalen Hodenanlagen in c.3 ml Nexmed (1 % (w/w) SDS, 2.5 % (w/w) Gardol, o.oo2 M EDTA, o.1 M NaCl, o.o2 M Tris/HCl, pH 7.6) (Schwochau, pers.Mitt.) in einem 1 ml-Dounce Homogenisator mit 6 Stößen des schwergängigen Pistills homogenisiert, das Homogenat auf einen 5-5o %igen (w/w) Saccharose-Gradienten (in o.o5 M Tris/HCl, pH 7.4) geschichtet und bei 0 ^{o}C und 4o ooo rpm für 15-17 Stunden zentrifugiert. Die Gradienten wurden im ISCO-System fraktioniert, der 38 S-Bereich, in dem sich der ribosomale Precursor (Molekulargewicht 2.6 x $1o^{6}$ Dalton) befindet, herausgeschnitten und die RNA mit NaCl und Äthanol gefällt.
Die gefällte RNA wurde anschließend über einer poly(U)-Sepharose-Säule aufgetrennt (s. Kapitel 8.3.) und nur die poly(A)$^{+}$-RNA für die reverse Transkription eingesetzt.

8.5. Auftrennung der RNA in exponentiellen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelgradienten

Wenn nicht anders beschrieben, wurde die RNA in 2.1-15 %igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelgradienten aufgetrennt. Diese wurden nach einer Methode von Lassak (1975) mit Hilfe einer Mischkammer in 3o cm langen Plexiglasröhrchen (ø 7 mm) auf ein 1o cm hohes Gelkissen (15 %) gegossen und besaßen eine Halbwertslänge von 2.5 cm .
Folgende Lösungen wurden verwendet:

1o x ERNA Stamm-Puffer:
o.4 M Triäthanolamin, o.2 M Natriumacetat, o.o2 M EDTA, pH 7.4 .

ERNA-Puffer:
1o % 1o x ERNA-Stamm-Puffer, 2.5 % Glyzerin, o.2 % SDS, o.1 % Natriumdesoxycholat.

Acrylamid-Stammlösungen:
I: für Gelkonzentrationen bis 8 %: 2o % Acrylamid, 1 % Bisacrylamid.
II: für Gelkonzentrationen >8 %: 3o % Acrylamid, o.5 % Bisacrylamid.

Die Gellösung mit niedriger Acrylamidkonzentration enthielt 2.5 % Glyzerin, 6 M Harnstoff und als Katalysator o.o35 % TEMED und

o.o35 % Ammoniumpersulfat. Die Gellösung mit hoher Acrylamidkonzentration enthielt 2o % Glyzerin, 4.5 M Harnstoff, o.oo5 % TEMED und o.oo5 % Ammoniumpersulfat.
Die entgasten Gellösungen wurden o.o2 %ig an Brij-35 gemacht und bis zum Gießen der Gele bei 4 °C gekühlt. Gießen und Polymerisation (15-2o Std.) der Gelgradienten erfolgte bei Zimmertemperatur.
Die pelletierte RNA wurde in o.1 ml UMA (ERNA, 6 M Harnstoff, o.o1 M Mercaptoäthanol) aufgenommen, für 2 min bei 8o °C erhitzt, nach vollständiger Abkühlung auf das Gel gegeben und anschließend mit ERNA überschichtet. Die Elektrophoresen wurden bei 4 °C mit 23o V für 2o-24 Std. durchgeführt (Ortec Netzteil). Das obere Elektrophoresebad wurde mit Hilfe eines Pufferaustauschsystems (Lassak, 1975; Nellen, 1975) mit 7o ml/Std. mit Hilfe einer LKB-Multiperpex-Pumpe kontinuierlich ausgetauscht. Als unteres Bad diente ein 45 cm hohes Gefäß mit 7 l Volumen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Absorptionsprofil der RNA im Chromoscan (Joyce-Loebl) gemessen; anschließend wurde das Gel auf Trockeneis gefroren, mit dem Gelschneidegerät (Mickle) in 1-3 mm dicke Scheibchen geschnitten und auf aschefreiem Filterpapier (Schleicher & Schüll) getrocknet. Zur Ermittlung der Radioaktivität wurden sie im Probenverbrennungsautomaten verbrannt. Als Szintillationscocktail wurden 12 ml Monophase-4o (für ^{3}H) und 12 ml Permafluor + 6 ml Carbosorb (für ^{14}C) verwendet. Die absolute Radioaktivität der Proben wurde im Szintillationszähler bestimmt.

Molekulargewichtsbestimmung

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde außer den ribosomalen RNAs von Drosophila hydei mit Molekulargewichten von o.7 und 1.4 x $1o^{6}$ Dalton (Perry et al., 197o) noch die ribosomalen RNAs von E.coli (Boehringer) mit Molekulargewichten von o.52 und 1.o5 x $1o^{6}$ Dalton (Spohr et al., 1976) verwendet.

3.6. Auswertung der Elektrophoresen

Zur Auswertung eines Doppelmarkierungsexperiments wurden die $^{14}C/^{3}H$-Verhältnisse jeder Probe berechnet und gegen die Probennummer aufgetragen (= $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurve). Ein Anstieg im $^{14}C/^{3}H$-Verhältnis

bedeutet eine relative Anreicherung in der ^{14}C-markierten Probe, ein Abfall eine relative Anreicherung der ^{3}H-markierten Probe. Die $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurve wurde im halblogarithmischen Maßstab aufgetragen.

9. Proteinisolation und Auftrennung der Proteine

Zur Auftrennung der Proteine wurden die RNPs in 8o µl Probenpuffer (o.o325 M Tris/SO_4^{--}, pH 6.9 , 1 % (w/w) SDS, 1o % (w/w) Mercaptoäthanol, 25 % (w/w) Saccharose) aufgenommen und 5 Minuten im Wasserbad erhitzt.
Die Proteine wurden in 9-2o %igen Polyacrylamid-Flachgel-Gradienten (Kloetzel, 1979) aufgetrennt. Die Elektrophoresen wurden von Herrn D Kloetzel durchgeführt.
Nach Beendigung der Elektrophoresen wurden die Gele in 1 mm-Scheibchen geschnitten und zur Bestimmung der Radioaktivität, wie in Kapitel 8.4. beschrieben, weiterverarbeitet.
Als Molekulargewichtsstandards dienten die ßß'-Untereinheit der RNA-Polymerase von E.coli (165 ooo und 155 ooo Dalton), Rinderserumalbumin (68 ooo Dalton), die α-Untereinheit der RNA-Polymerase von E.coli (39 ooo Dalton) und der Trypsininhibitor von Sojabohnen (21 5oo Dalton).

1o. Elektronenmikroskopische Untersuchung des RNP-PP

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde das RNP-PP, wie i Kapitel 6.1. beschrieben, isoliert und in o.18 ml PMK (o.o1 M Phosphatpuffer, pH 7.2 , o.o1 M $MgCl_2$, o.o1 M KCl) resuspendiert. Es wurde dann entweder direkt fixiert oder aber mit einer der folgenden Lösungen behandelt:
- RNase T_1 (o.5 µg/ml PMK, 5 Minuten)
- Formamid (9o %, 5 Minuten)
- Harnstoff (8 M in H_2O, 5 Minuten)

Die RNP-Partikel wurden in mit KOH neutralisiertem Formaldehyd (Endkonzentration 3.7 %) fixiert und auf Parlodion befilmte Netzchen aufgebracht.
Anschließend wurden die Proben mit Phosphorwolframsäure (1:3 mit 96 %igem Äthanol verdünnt) für eine Minute kontrastiert, mit Äthanol

gewaschen und luftgetrocknet.
Einige Präparate wurden in der Edward's Bedampfungsanlage mit Gold-Palladium rotationsbedampft.
Die Präparate wurden im Philips EM 3oo untersucht.
Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr.K.H.Glätzer und Dr.J.Sommerville durchgeführt.

11. Filterhybridisierung der RNP-PP-RNA

11.1. DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus adulten Fliegen wurde nach einer Methode von Schwochau (pers.Mitt.) durchgeführt.
Je 1 g Fliegen (diese hatten zuvor 2 Tage gehungert und waren dann bei -2o °C eingefroren worden) wurde in flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser pulverisiert und in 1 ml DNA-Lyse-Puffer aufgenommen (o.1 M EDTA, o.1 M NaCl, 1 % (w/w) Gardol, o.o5 M Tris/HCl, pH 8.o), der 1 mg Proteinase K/ml enthielt. Nach Zugabe von 8 ml DNA-Lyse-Puffer (mit o.2 ml Mercaptoäthanol/1oo ml) von 8o °C wurde das Homogenat für 3-4 Stunden bei 5o °C inkubiert. Anschließend wurde dieses Lysat mit gesättigter CsCl-Lösung in o.1 x SSC (1 x SSC = o.15 M NaCl, o.o15 M Natriumcitrat, pH 7.o) auf eine Dichte von 1.7oo g/cm^3 gebracht und im VTi 5o Rotor bei 41 ooo rpm und 2o °C für 2o-3o Stunden zentrifugiert. Das auf dem Gradienten flotierende Material - Chitinreste, Borsten, Proteine - wurde vorsichtig entfernt, etwa ein Drittel des Gradienten abgeschöpft und das Röhrchen unten mit einer heißen Nadel angestochen, so daß der Gradient bis zur Dichteposition der DNA ausfließen konnte. Der restliche Gradient mit der DNA wurde mit einer CsCl-Lösung der Dichte 1.7oo g/cm^3 (in o.1 x SSC) aufgefüllt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert.
Die Gradienten wurden im ISCO-System fraktioniert. Die DNA wurde über Nacht gegen o.1 x SSC dialysiert. Die Mengenbestimmung erfolgte über die Messung der Hyperchromizität im Gilford 25o Spektrophotometer bei 26o nm. Sie betrug 3o-35 %.

11.2. Filterhybridisierung

Die Filterhybridisierungen wurden in Anlehnung an die Methode von Gillespie und Spiegelman (1965) durchgeführt.
Die Filter wurden mit je 2 µg DNA (aus Wildtyp-Männchen, Wildtyp-Weibchen und Männchen des Stammes 7o3/33) beladen. Als Kontrolle dienten Filter, die mit der gleichen Menge Micrococcus lysodeicticus-DNA beladen waren.
Die DNA (in o.1 x SSC) wurde in o.33 N NaOH für 1.5 Stunden bei 37 °C denaturiert, auf 6 x SSC und o.oo6 M $MgCl_2$ gebracht und mit 1 N HCl neutralisiert. Die DNA-Proben wurden mit dem Millipore-Vielfach-Filtrationsgerät 3o25 auf die Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schüll; ø 25 mm; o.45 µm Porengröße. Diese waren zuvor in 6 x SSC, o.oo6 M $MgCl_2$ getränkt worden und wurden anschließend im Vakuumschrank evakuiert) aufgebracht und mit ca. 2o ml 6 x SSC gespült. Nach dem Trocknen der Filter (3 Stunden bei Zimmertemperatur und 15 Stunden bei 8o °C) wurden sie in einer Lösung aus 4 x SSC, o.o2 % Rinderserumalbumin, o.o2 % Polyvinylpyrrolidon, o.o2 % Ficoll (Denhardt, 1965) bei 65 °C für 4-6 Stunden inkubiert und dann luftgetrocknet.
Die ^3H-markierte RNP-PP-RNA, die zuvor über CsCl gereinigt worden war (s.Kapitel 8.2.) und eine spezifische Aktivität von 1-5 x $1o^5$ dpm/µg besaß, wurde in 1.5 ml 6 x SSC, 5o % Formamid gelöst und in silikonisierte Szintillationsgläschen gegeben. Die zuvor mit 6 x SSC, 5o % Formamid befeuchteten Filter wurden in die RNA-Lösung gegeben.
Die Hybridisierung erfolgte bei 45 °C für 24-5o Stunden.
Nach der Hybridisierung wurden die Filter bei Zimmertemperatur für jeweils 3o Minuten in je 2oo ml wie folgt gewaschen: 3 mal 2 x SSC, einmal RNase A (1o µg/ml 2 x SSC), zweimal 2 x SSC. Nach kurzem Spülen in 7o %igem Äthanol wurden die Filter alkoholfeucht in je 1o ml Instagel gegeben, über Nacht gelöst und im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt.
In jeder Versuchsserie wurden jeweils drei Filter pro Genotyp hybridisiert.
DNA-Verluste vom Filter wurden nicht bestimmt.

12. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Rosen et al. (1976) und nach Angaben von Herrn Professor Dr.Beard. Das Reaktionsgemisch hatte ein Volumen von 25 µl und setzte sich wie folgt zusammen: o.o5 M Tris/HCl, pH 8.3 , o.oo6 M $MgCl_2$, o.o4 M KCl, o.o2 M DTT, 1oo µg/ml Rinderserumalbumin, 9-12 µg/ml oligo $d(pT)_{12-18}$, 5o µg/ml Actinomycin D, je 25 µM ^{3}H-dATP, ^{3}H-dCTP, ^{3}H-dGTP, ^{3}H-dTTP und 12o Units/ml Reverse Transkriptase (das Enzym wurde uns freundlicherweise von Professor Dr.Beard,USA, zur Verfügung gestellt.).

Die Inkubation wurde für 15 Minuten bei 37 °C durchgeführt, die Reaktion danach in Eis gestoppt. Pro Ansatz wurden 1-5 µg poly(A)$^+$-RNP-PP-RNA bzw. 38 S-rRNA eingesetzt.
Zur Abtrennung der nicht eingebauten ^{3}H-desoxy-Triphosphate wurde das Reaktionsgemisch auf eine Sephadex G-75 Säule (8 x o.6 cm) in Säulenpuffer (o.o6 M NaCl, o.oo6 M $MgCl_2$, o.o5 M Tris/HCl, pH 8.3) gegeben, Fraktionen à 3o µl gesammelt und das Elutionsprofil durch Radioaktivitätsmessung von je 2 µl Aliquots (in 1o ml Instagel) ermittelt. Die Ausschlußfraktion wurde durch Zugabe von 1 N NaOH auf eine Konzentration von o.33 N NaOH gebracht, die RNA für 5 Minuten bei 8o °C hydrolysiert und die Lösung mit 1 N HCl neutralisiert. Nach Zugabe von tRNA (Boehringer) (Endkonzentration 1o µg/ml) wurde die cDNA mit NaCl und doppeltem Volumen Äthanol für mindestens 12 Stunden bei -2o °C gefällt.

13. In-situ Hybridisierungen

13.1. Anfertigung von Spermatocytenkern-Präparaten

Aus Larven des dritten Larvenstadiums wurden die Hodenanlagen in Drosophila Ringer herauspräpariert, in 1o µl Drosophila Ringer auf einen chromschwefelsäure-gereinigten Objektträger überführt und mit einem Deckglas (18 x 18 mm, zuvor in 1 N HCl gekocht und silikonisiert) zugedeckt. Sehr leichtes Beklopfen des Deckglases mit einem Bleistift bewirkte das Platzen der Hodenanlage, die anschließend durch leichten Daumendruck auf das Deckglas gequetscht wurde, wobei der überschüssige Ringer mit Filterpapier seitlich abgesaugt wurde.

Der Objektträger wurde in flüssigen Stickstoff getaucht, das Deckglas mit einer Apollo-Klinge abgesprengt und das Präparat sofort in 96 %igem Äthanol für 3o Sekunden fixiert, luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung staubfrei aufbewahrt.

13.2. Präparation von polytänen Chromosomen

Aus Larven des dritten Larvenstadiums, die zur Verpuppung den Futterbrei verlassen hatten, wurden die Speicheldrüsen in 1 % Na-citrat herauspräpariert, in 2o µl 45 %ige Essigsäure auf einen chromschwefelsäure-gereinigten Objektträger überführt und mit einem Deckglas (18 x 18 mm, vorher in 1N HCl gekocht und silikonisiert) abgedeckt. Durch leichtes Beklopfen mit einer kleinen Pinzette wurde das Gewebe zunächst mazeriert. Anschließend wurde das Präparat zum Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit mit einem Streifen Filterpapier bedeckt und mit einer großen Pinzette bis zur Bruchgrenze beklopft. Dadurch wurde die Kernmembran zerstört und die Chromosomen gespreitet. Durch Überrollen mit einer Stahlwalze konnte eine optimale Quetschung erzielt werden (Nellen, pers.Mitt.).
Die Objektträger wurden durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren, das Deckglas mit einer Apollo-Klinge abgesprengt, das Präparat sofort in Alkohol-Eisessig (3:1) für 5 Minuten fixiert und danach für weitere 5 Minuten in 96 %igem Äthanol gewaschen. Nach Lufttrocknung wurden die Präparate bis zur weiteren Verwendung staubfrei aufbewahrt.

13.3. Durchführung der in-situ Hybridisierungen

Die in-situ Hybridisierung an die DNA der polytänen Chromosomen wurde in Anlehnung an Pardue und Gall (1975) durchgeführt.
Für die RNase-Behandlung wurde auf jeden Objektträger 5o µl RNase A-Lösung (1oo µg/ml 2 x SSC) gegeben, das Präparat mit einem Deckglas abgedeckt und eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Abschwimmen der Deckgläser in 2 x SSC wurden die Präparate für jeweils 5 Minuten wie folgt gewaschen: dreimal in 2 x SSC, zweimal in 7o %igem Äthanol, zweimal in 96 %igem Äthanol. Nach Lufttrocknung der Präparate wurden die Chromosomen

in o.o7 N NaOH für 3 Minuten bei Zimmertemperatur denaturiert und erneut für jeweils 5 Minuten zweimal in 7o %igem und zweimal in 96 %igem Äthanol gewaschen und luftgetrocknet.
Die Hybridisierung der cDNA an die RNA der Lampenbürstenschleifen wurde in Anlehnung an Pukkila (1975) durchgeführt.
Hierbei entfiel die RNase-Behandlung und die Denaturierung der Chromosomen.
Um die Kernmembran durchgängiger und die RNA zugängiger für die cDNA zu machen, wurde eine kurze Proteinase K-Behandlung der Spermatocytenkernpräparate durchgeführt: hierzu wurden 25 µl Proteinase K-Lösung (o.5 µg/ml, in o.o5 M Tris/HCl, pH 7.4 , o.oo1 % SDS) auf die Präparate gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und 15 Sekunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Deckglas wurde anschließend in 2 x SSC abgeschwemmt und das Präparat je 5 Minuten in 7o %igem und 96 %igem Äthanol gewaschen und dann luftgetrocknet.

Die pelletierte cDNA wurde in 4 x SSC, 5o % Formamid aufgenommen. Zur Vermeidung unspezifischer Hybridisierungen wurde Kalbsthymus-DNA (Serva) in ca. 2ooofachem Überschuß zugegeben (diese war zuvor in o.1 N NaOH für 5 Minuten bei 8o ^{o}C denaturiert, mit HCl neutralisiert und für eine Stunde bei -3o ^{o}C mit Äthanol gefällt worden). Auf jedes Präparat wurden 1.5 x $1o^{5}$ dpm (38 S-cDNA) bzw. 2.5 x $1o^{5}$ dpm (RNP-PP-cDNA) in 2o µl gegeben. Das Präparat wurde mit einem silikonisiertem Deckglas abgedeckt und in einer feuchten Kammer (2o x SSC) bei 37 ^{o}C für 24 Stunden (38 S-cDNA) bzw. 62 Stunden (RNP-PP-cDNA) hybridisiert. Nach dem Abschwemmen der Deckgläser in 2 x SSC wurden die Präparate folgendermaßen für je 5 Minuten gewaschen (Hennen et al., 1975): dreimal in 2 x SSC bei Zimmertemperatur, dreimal in 2 x SSC bei 6o ^{o}C, einmal in 2 x SSC bei Zimmertemperatur, einmal in 5 % (w/v) TCA bei 5 ^{o}C, dreimal in 7o %igem Äthanol und einmal in 96 %igem Äthanol.

13.4. Autoradiographie

Die Präparate wurden in Kodak NTB-2 Emulsion (1:1 mit Wasser verdünnt) bei 45 ^{o}C getaucht und bei 4 ^{o}C für die jeweils angegebene Zeit exponiert.

Die Autoradiographien wurden in Kodak D 19 Entwickler (1:1 mit Wasser verdünnt) für 1.5 Minuten entwickelt, 3o Sekunden zwischengewässert, 15 Minuten fixiert (Agfa Acidofix) und 15 Minuten gewässert.

Die Spermatocytenkernpräparate wurden mit Eosin für 3–4 Stunden gefärbt (Glätzer, pers.Mitt.): 1 ml Eosinlösung (o.1 g Eosin, wasserlöslich, in 4o ml Glyzerin und 4o ml Methanol) + 49 ml Natriumacetatpuffer (o.465 M Natriumacetat, o.o24 M Essigsäure, pH 2.8 mit HCl). Anschließend wurden die Präparate dreimal mit H_2O gewaschen, luftgetrocknet und mit Euparal eingedeckt.

III. Ergebnisse

1. Kernisolation

Ribonukleoproteinpartikel findet man in der Zelle sowohl im Cytoplasma (z.B. Ribosomen, mRNPs) als auch im Zellkern, wobei der mengenmäßige Anteil der cytoplasmatischen Partikel sehr stark überwiegt. Eine Anreicherung von Kern-RNPs ist in manchen Geweben durch differentielle Zentrifugation des Gesamthomogenats möglich (Sommerville, 1973), bei larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei jedoch nicht durchführbar (Knust, 1975). Deshalb war es erforderlich, eine Kernisolierung durchzuführen, um damit Kern-spezifische Strukturen frei von cytoplasmatischer Kontamination zu gewinnen.
Die hierzu verwendete Methode muß dabei zwei Bedingungen erfüllen:

a) Die Zellkerne dürfen nicht beschädigt werden, d.h. die Kernmembran muß intakt bleiben und die im Kern enthaltenen Strukturen, bei Spermatocytenkernen also besonders die Lampenbürstenschleifen, sollten nicht zerstört werden.
b) Die cytoplasmatischen Verunreinigungen sollten so gering wie möglich sein, ohne daß durch die hierzu nötigen Reinigungsschritte die Kernausbeute verringert wird.

1.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der Kernfraktion

Untersuchung der Kernsuspension im Phasenkontrastmikroskop zeigt, daß die birnenförmige Gestalt der Spermatocytenkerne durch die Isolationsmethode nicht verändert wird und auch die Strukturen im Kern recht gut erhalten bleiben: der Nukleolus ist gut zu erkennen und die Lampenbürstenschleifen, besonders der Pseudonukleolus, bleiben in ihrer Form erhalten (Abb. 2 a). Eine Übersichtsaufnahme der Präparation zeigt nur geringe Verunreinigung durch andere Partikel (Abb. 2 b).

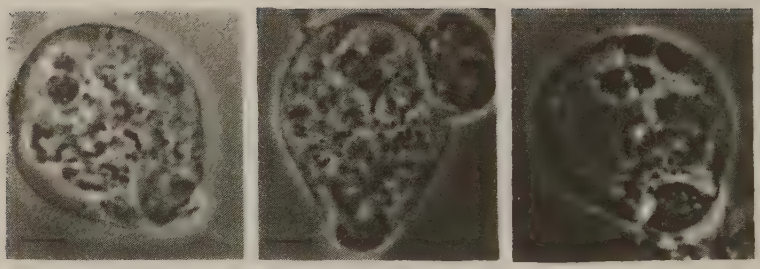


Abbildung 2 a : Phasenkontrastaufnahmen isolierter Spermatocytenkerne. Der Strich entspricht 5 µm

Abbildung 2 b: Phasenkontrastaufnahme isolierter Spermatocytenkerne. Der Strich entspricht 1o µm

1.2. Bestimmung der Ausbeute

Aus einer Präparation von 5oo Hodenanlagen konnten etwa 1–1.2 x $1o^5$ Spermatocytenkerne isoliert werden, was durch Auszählen in einer Thoma-Zählkammer bestimmt wurde. Legt man eine Gesamtzahl von etwa 3oo Spermatocytenkernen pro Hodenanlage zu Grunde (Renkawitz, pers. Mitt.), so entspricht das einer Ausbeute von 6o–8o %.

1.3. Malat-Dehydrogenase-Test

Malat-Dehydrogenase (MDH) ist ein Enzym, das in den Mitochondrien vorkommt und dort im Zitronensäurezyklus folgende Reaktion katalysiert:

$$\text{L-Malat} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + NADH + H^+$$

wobei das Gleichgewicht dieser Reaktion in neutraler Lösung weit auf der linken Seite liegt.
Die Ergebnisse des MDH-Tests sind in Tabelle 1 dargestellt; dabei ist die Absorptionszunahme pro Minute ein Maß für die Enzymaktivität.

		Kerne	Cytoplasma
I	gemessene Absorptionszunahme/min/5o µl	o.oo875	o.o31
II	Gesamtvolumen [ml]	o.2	2.4
III	Absorptionszunahme bezogen auf das Gesamtvol.	o.o35	1.44
IV	% der Enzymaktivität	2.3	97.7

Tabelle 1: Bestimmung der MDH-Aktivität in den Kernen und im Cytoplasma

Die Summe der Werte in der Reihe III ist eine Maßzahl für die Enzymaktivität in der gesamten Zelle.
Die Daten zeigen, daß sich in der Kernfraktion nur 2.3 % der gesamten Malat-Dehydrogenase-Aktivität befinden.
Auf Grund dieser niedrigen cytoplasmatischen Kontamination wurde auf eine weitere Reinigung der Kernfraktion verzichtet.

1.4. Vergleich der RNA in Spermatocytenkernen und Gesamthodenanlagen

Eine weitere Möglichkeit, die Reinheit der Kernfraktion zu überprüfen, bietet ein Doppelmarkierungsexperiment (Markierungsdauer: 24 Stunden), in dem die RNA aus isolierten Spermatocytenkernen mit der aus den gesamten Hodenanlagen verglichen wird (Abb.3).

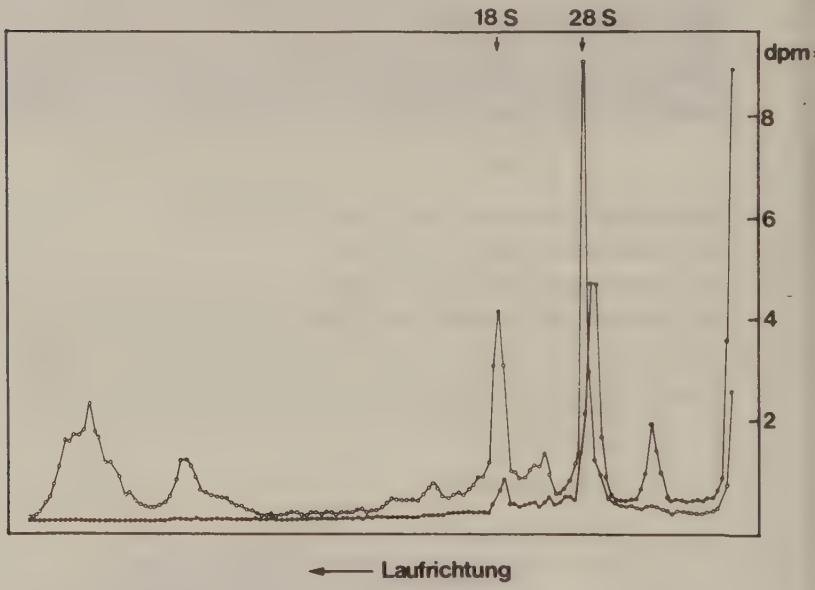


Abbildung 3: Elektrophoretische Auftrennung der RNA aus Spermatocytenkernen (^{3}H-markiert, •••••) und Gesamthodenanlagen (^{14}C-markiert, -o-o-o-) in einem homogenen, 2.2 %igen Polyacrylamidgel.

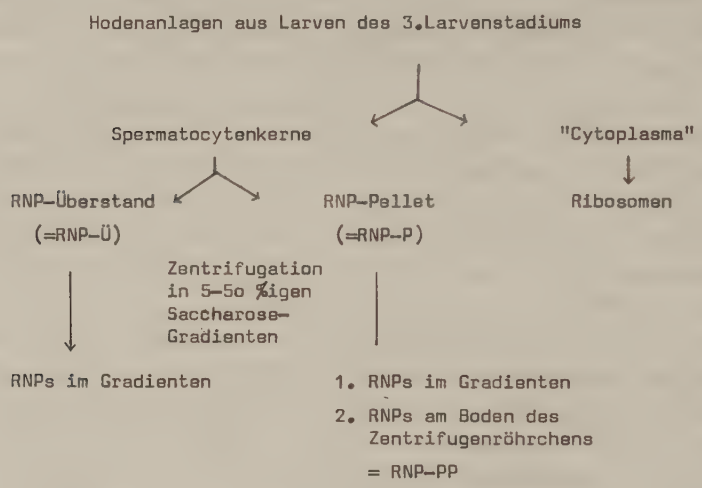
Die beiden Fraktionen unterscheiden sich hauptsächlich im Gehalt der ribosomalen RNA: während man in den Gesamthodenanlagen überwiegend die RNAs der ribosomalen Untereinheiten, 18 S und 28 S-rRNA (diese S-Werte entsprechen nicht den tatsächlichen Sedimentationskoeffizienten, sondern werden als Bezeichnung der RNAs der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit verwendet) im erwarteten Verhältnis von 1:2 findet, kommen in der Kernfraktion fast ausschließlich die Vorstufen dieser RNAs vor, die Molekulargewichte von 1.5 und 2.6 x 10^6 Dalton besitzen (Meyer und Hennig, 1974; Meyer,1975). Die 18 S-rRNA, die beim Processing aus der 2.6 x 10^6 Dalton -Vorstufe zur 1.5 x 10^6 Dalton-RNA entsteht, ist im Kern sehr stark unterrepräsentiert, da sie vermutlich sofort nach ihrer Fertigstellung ins Cytoplasma transportiert wird, wie es auch für HeLa-Zellen nachgewiesen ist (Mirault und Scherrer, 1971).
Die in der Kernfraktion gefundene RNA, die ein geringfügig höheres Molekulargewicht besitzt als die 18 S-rRNA des Cytoplasmas, stellt möglicherweise eine Vorstufe dieser RNA dar. Eine solche Vorstufe zur 18 S-rRNA bei D.hydei wurde schon von Meyer (1975) diskutiert und ist für Chironomus nachgewiesen (Edström und Daneholt, 1967).

In den Gesamthodenanlagen kommen außerdem noch RNAs mit kleineren Molekulargewichten vor, z.B. die RNAs der mitochondriellen ribosomalen Untereinheiten mit Molekulargewichten von 2.9 und 5.2 x 10^5 Dalton (Knust, 1975; Lassak, 1975; Nellen, 1975;Zielke, 1978). Das Fehlen dieser RNAs in der Kernfraktion bestätigt die geringe cytoplasmatische Kontamination und steht damit in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des MDH-Tests.

Außer den genannten Unterschieden in der ribosomalen RNA kann man weiterhin feststellen, daß der Anteil an hochmolekularer RNA (mit Molekulargewichten $> 1.5 \times 10^6$ Dalton) im Kern größer ist als im Gesamthoden. Zwischen 3 und 6 x 10^5 Dalton, einem Molekulargewichtsbereich, in dem sich der größte Teil der mRNAs befindet, überwiegt der Anteil an cytoplasmatischer RNA, die man hauptsächlich bei der Untersuchung der Gesamthodenanlagen erfaßt.

2. Fraktionierung der larvalen Hodenanlagen

Im folgenden Schema sind die bei der Fraktionierung der larvalen Hodenanlagen isolierten und untersuchten Fraktionen aufgeführt:



3. Die RNA des "Cytoplasmas"

Zur Klärung der Frage, ob sich möglicherweise schon in der cytoplasmatischen RNA der Hodenanlagen Unterschiede zwischen dem X/Y- und X/O-Genotyp finden lassen, die auf eine am Y-Chromosom transkribierte und ins Cytoplasma transportierte RNA hindeuten, wurde die RNA der bei der Kernisolation gewonnenen "Cytoplasma"-Fraktion auf einer poly(U)-Säule fraktioniert und anschließend in Polyacrylamid-Harnstoff-Gelgradienten aufgetrennt (Abb.4 und Abb.5).

Die poly(A)$^-$-RNA, (das ist die RNA, die nicht an die poly(U)-Sepharose-Säule bindet), setzt sich hauptsächlich aus ribosomaler RNA zusammen (Abb.4):

a) 28 S-rRNA (mit dieser Bezeichnung ist die RNA in der großen, ribosomalen Untereinheit im Cytoplasma gemeint, die ein Molekulargewicht von $1.4 \times 1o^6$ Dalton besitzt): diese ist zum

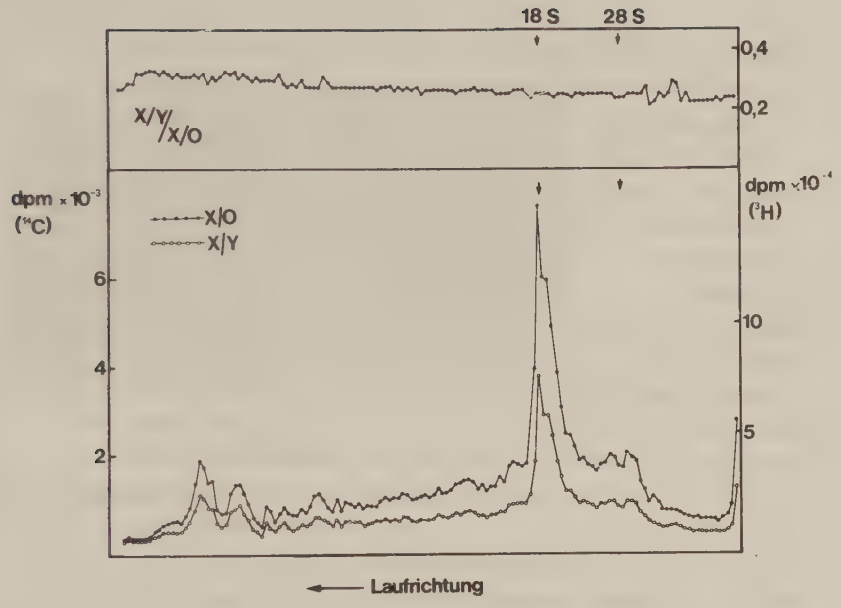


Abbildung 4 : Elektrophoretische Auftrennung der cytoplasmatischen poly(A)$^-$-RNA

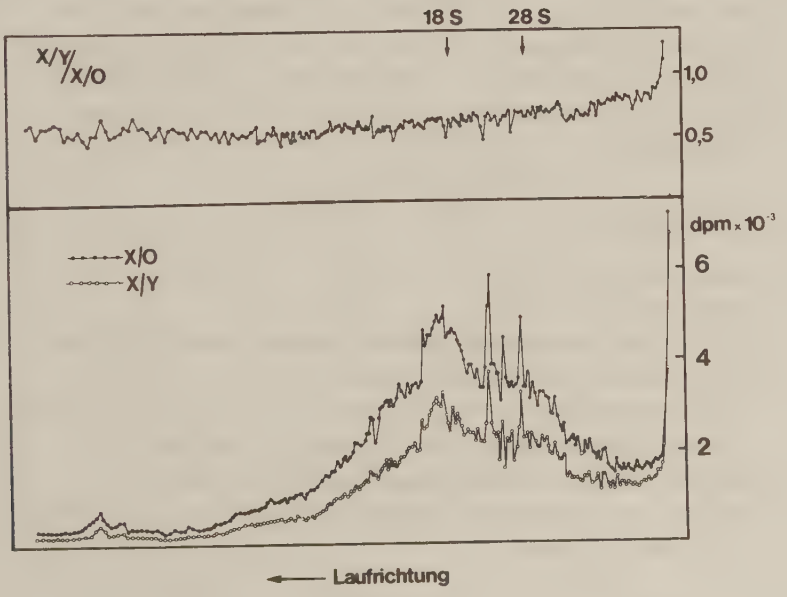


Abbildung 5 : Elektrophoretische Auftrennung der cytoplasmatischen poly(A)$^+$-RNA

größten Teil hitzelabil und dissoziiert unter den hier angewendeten Bedingungen in o.75 und o.65 x $1o^6$ Dalton-Bruchstücke (Schwochau et al., 1976). Unter nicht denaturierenden Bedingungen findet keine Dissoziation der 28 S-rRNA statt (s.Abb.3).

b) 18 S-rRNA: diese läßt sich von den beiden Bruchstücken der 28 S-rRNA nicht trennen und wandert im Gel mit diesen in einem breiten Peak.

c) 5 S-RNA.

Außerdem befindet sich tRNA in der poly(A)$^-$-Fraktion des "Cytoplasmas".

Die poly(A)$^+$-RNA,(das ist die RNA, die an die poly(U)-Sepharose-Säule bindet), macht ca. 9 % der markierten cytoplasmatischen RNA aus und erstreckt sich über einen Molekulargewichtsbereich von o.3 x $1o^6$ bis etwa 1.4 x $1o^6$ Dalton. Der größte Teil befindet sich bei etwa o.5 x $1o^6$ Dalton, was gut mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht von mRNAs übereinstimmt (Abb.5).

Signifikante Unterschiede zwischen der X/Y- und X/O-RNA findet man in diesen beiden Fraktionen keine, wie aus dem Verlauf der $^{14}C/^3H$-Verhältniskurve zu ersehen ist (Abb.4 und Abb.5).

Der Vergleich der RNA-Profile in Abb.4 und Abb.5 macht deutlich, daß durch Fraktionierung auf einer poly(U)-Sepharose-Säule eine gute Trennung von poly(A)-haltiger und nicht poly(A)-haltiger RNA erzielt wird: der Anteil an ribosomaler RNA, die den Hauptanteil der poly(A)$^-$-Fraktion ausmacht, in der poly(A)$^+$-Fraktion ist äußerst gering.

4. RNP-Isolation

Bei den folgenden Experimenten wurde von zwei Voraussetzungen ausgegangen:

1. Das an den Lampenbürstenschleifen akkumulierte Material besteht aus Ribonukleoproteinpartikeln (Hennig, 1967);

2. Ein Vergleich der Spermatocytenkerne aus X/Y- und X/O-Männchen im Phasenkontrastmikroskop (Abb.6) zeigt, daß der Zellkern aus Wildtyp-Männchen angefüllt ist mit Material der Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms, während der X/O-Zellkern vergleichsweise "leer" erscheint.

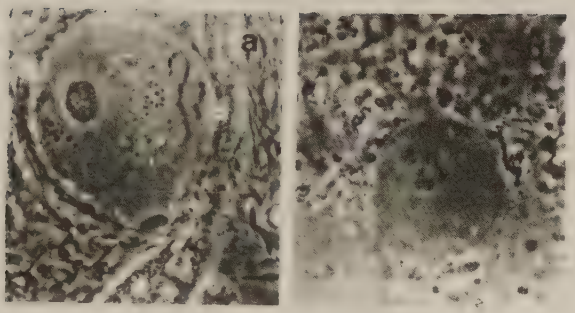


Abbildung 6 : Kerne primärer Spermatocyten von X/Y- (a) und X/O-(b) Männchen von Drosophila hydei. Der Strich entspricht 5 µm.

Unter der Voraussetzung, daß die an den Lampenbürstenschleifen akkumulierte RNA vom Y-Chromosom selbst codiert ist (Hennig, 1968), sollten durch vergleichende Untersuchungen der RNP-Partikel aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen in Doppelmarkierungsexperimenten RNP-Partikel des Y-Chromosoms isoliert werden können.

4.1. Die Untersuchung des RNP-Überstands

Im RNP-Überstand, den man durch eine 10 000 g-Zentrifugation des Kern-Homogenats gewinnt, befinden sich nach einer 24-stündigen Markierung etwa 60 % der radioaktiv-markierten RNA. Das Sedimentationsverhalten der im RNP-Überstand befindlichen RNPs unter Standardbedingungen zeigt die Abb.7 an Hand der Radioaktivitätsverteilung.
Man erhält zwei RNP-Fraktionen, von denen die langsam sedimentierende (=Ü I) einen Sedimentationskoeffizienten von ca. 4o S besitzt, während die größere RNP-Fraktion (=Ü II) eine heterogene Fraktion mit S-Werten zwischen 3o S und 9o S darstellt.
Eine gleiche Radioaktivitätsverteilung findet man auch bei Auftrennung des RNP-Überstands aus X/O-Spermatocytenkernen: es treten die gleichen RNP-Fraktionen wie im Wildtyp auf.

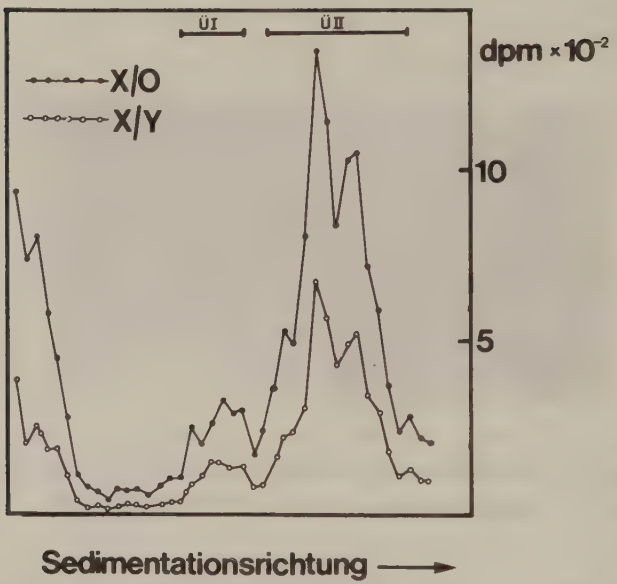


Abbildung 7 : Auftrennung des RNP-Überstands aus X/Y- (^{14}C) und X/O- (^{3}H) Spermatocytenkernen in einem 5-5o %igen Saccharose-Gradienten. Die Kurve gibt die Radioaktivitätsverteilung der markierten RNA wieder.

4.1.1. Die RNA des RNP-Überstands

Zur Charakterisierung der beiden RNP-Fraktionen aus dem RNP-Überstand wurde die RNA aus Ü I und Ü II isoliert und aufgetrennt. Dabei kommt man zu folgenden Ergebnissen:

- Die kleinere RNP-Fraktion enthält überwiegend 13 S-RNA (Molekulargewicht o.7 x $1o^6$ Dalton), außerdem geringe Mengen 1.5 und 2.6 x $1o^6$ Dalton-RNA.
- Die beiden letzten RNA-Species sind die Haupt-RNA-Komponenten der schneller sedimentierenden Fraktion (Ü II).
- Die gleichen RNA-Sorten findet man auch in den entsprechenden RNPs aus X/O-Hodenanlagen.

Das bedeutet, daß die Hauptmasse dieser RNPs und die in ihnen enthaltene RNA keine Beziehung zu den Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms haben.

Um jedoch RNAs erfassen zu können, die sich zwar auch im RNP-Überstand befinden, aber durch die Menge an prä-ribosomaler RNA verdeckt werden, wurde die RNA aus dem gesamten RNP-Überstand (ohne vorherige Fraktionierung in einem Saccharose-Gradienten) auf einer poly(U)-Sepharose-Säule aufgetrennt. Daraus ergab sich, daß ca. 6 % der (markierten) RNA an die poly(U)-Sepharose-Säule binden, während 94 % ungebunden die Säule passieren. Die Auftrennung dieser RNAs in denaturierenden Polyacrylamid-Gelgradienten ist in Abb.8 und Abb.9 dargestellt:

- In der poly(A)$^-$-Fraktion (Abb.8) befinden sich hauptsächlich RNAs mit Molekulargewichten, die denen der ribosomalen RNAs bzw. denen ihrer Vorstufen entsprechen, also hauptsächlich 2.6 und 1.5 x 10^6 Dalton-RNA und sehr geringe Mengen o.7 x 10^6 Dalton-RNA.

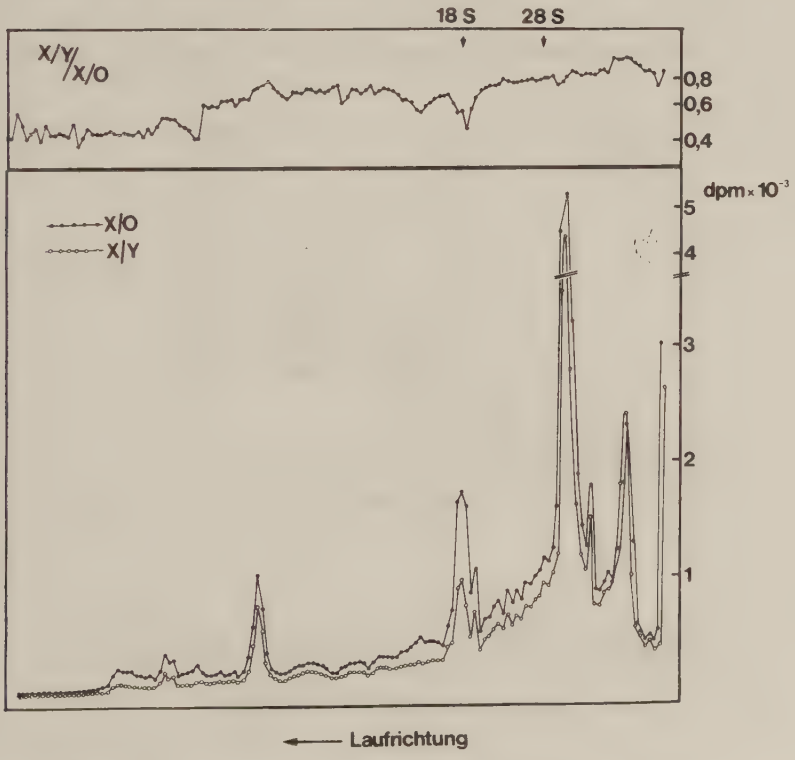


Abbildung 8 : Elektrophoretische Auftrennung der poly(A)$^-$-RNA des RNP-Überstands aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen.

- Die poly(A)-haltige RNA stellt eine heterogene RNA-Population mit Molekulargewichten zwischen 3×10^5 und 1.4×10^6 Dalton dar (Abb.9).
- Weder in der poly(A)$^+$- noch in der poly(A)$^-$-RNA findet man einen signifikanten $^{14}C/^3H$-Unterschied in einer bestimmten RNA-Sorte. Auftretende geringe Abweichungen nach oben oder nach unten können nicht als signifikante Unterschiede betrachtet werden.

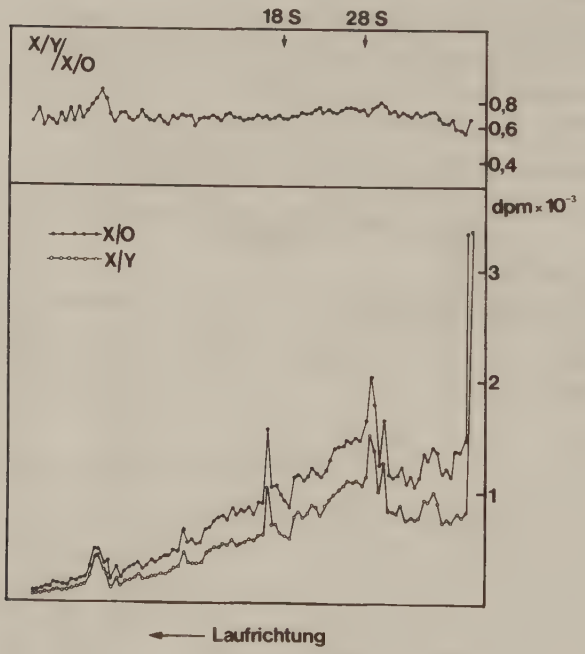


Abbildung 9 : Elektrophoretische Auftrennung der poly(A)$^+$-RNA des RNP-Überstands aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der RNP-Überstand hauptsächlich prä-ribosomale Partikel enthält, was auch durch die Ergebnisse der Proteinanalysen dieser RNP-Partikel im Vergleich zum Proteinmuster aus cytoplasmatischen Ribosomen belegt wird.

Zu diesem Zweck wurde eine Methode zur Isolierung von Ribosomen aus larvalen Hodenanlagen entwickelt. Diese sollte zwei Kriterien berücksichtigen:

1. die Konzentration an zweiwertigen Ionen mußte so niedrig sein, daß die Ribosomen in die Untereinheiten dissoziierten;
2. die Konzentration der einwertigen Ionen durfte nicht zu hoch sein, damit keine differentielle Ablösung von Proteinen stattfindet.

Die Auftrennung der Ribosomen aus den larvalen Hodenanlagen zeigt die Abb.1o: die Bedingungen waren so gewählt, daß nur noch sehr geringe Mengen Monosomen (8o S) undissoziiert vorlagen.

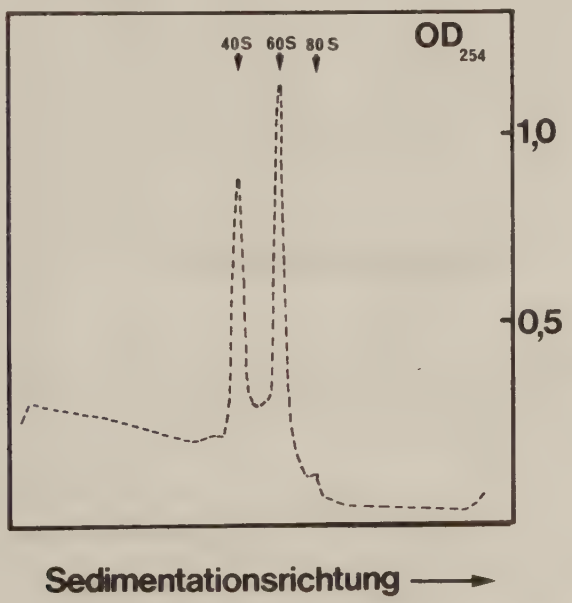


Abbildung 1o : Auftrennung der ribosomalen Untereinheiten aus larvalen Hodenanlagen in einem 15-45 %igen Saccharose-Gradienten.

4.1.2. Die Proteine des RNP-Überstands

Die Einbaurate von radioaktiv-markierten Aminosäuren in die RNP-Proteine des RNP-Überstands war sehr gering (trotz Verwendung von drei markierten Aminosäuren), weshalb die genaue Lokalisation der RNP-Partikel im Saccharose-Gradienten nicht möglich war (Abb.11).

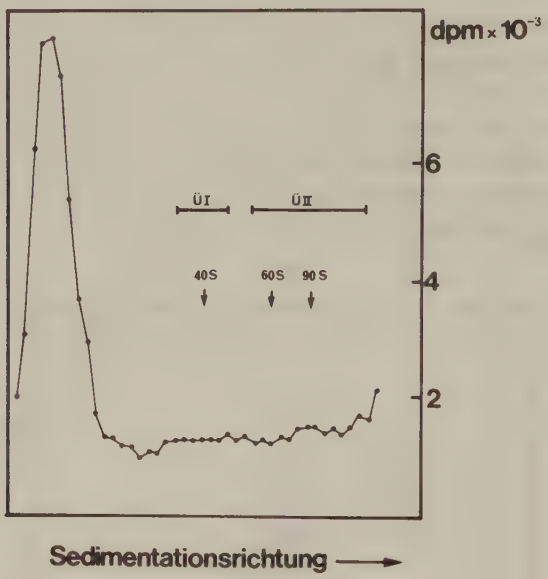


Abbildung 11 : Auftrennung des RNP-Überstands in einem 5-5o %igen Saccharose-Gradienten. Die Kurve gibt die Radioaktivitätsverteilung der markierten Proteine wieder.

Eine Isolierung der beiden RNPs (Ü I und Ü II) konnte deshalb nur durch gleichzeitige Markierung mit Uridin und im Vergleich zu Abb.7 durchgeführt werden.
Der Vergleich der Proteine aus Ü I und Ü II mit den Proteinen der kleinen und großen Untereinheit der cytoplasmatischen Ribosomen führt zu folgenden Ergebnissen (Abb. 12 a-d):

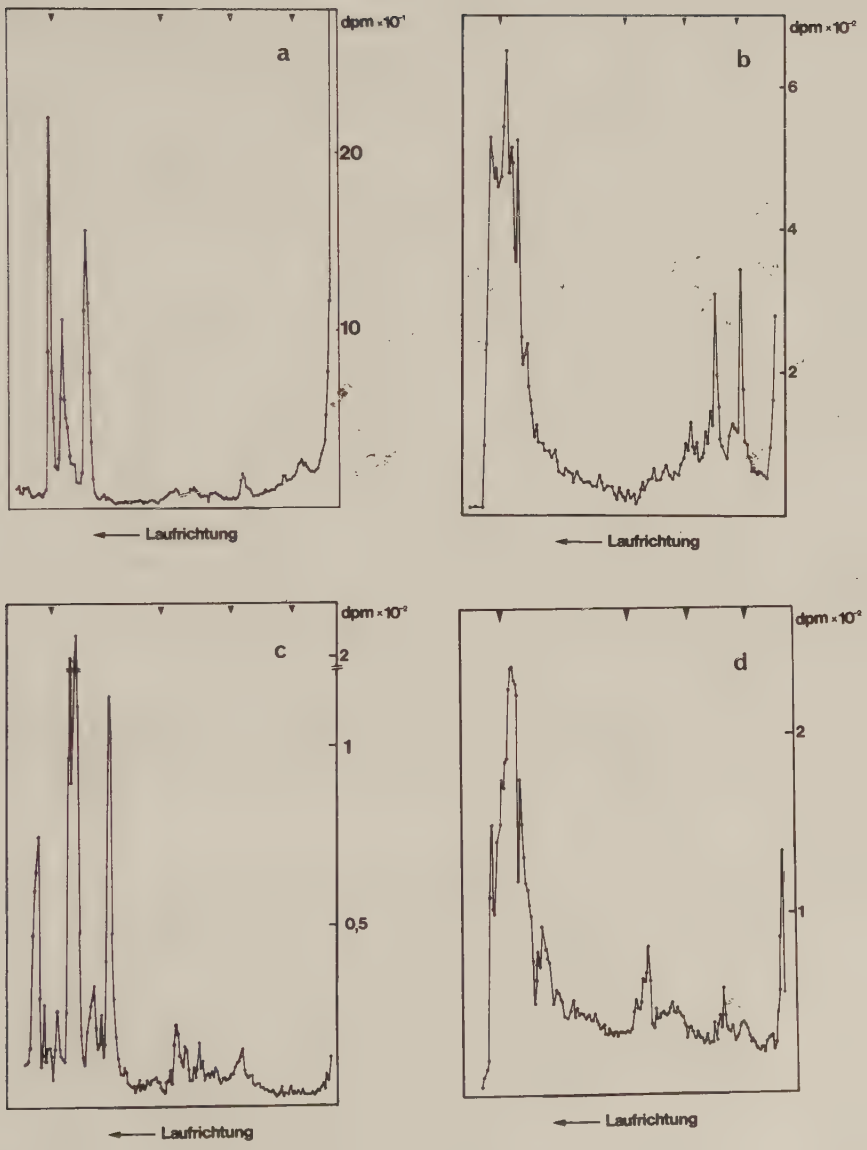


Abbildung 12 : Elektrophoretische Auftrennung der Proteine aus (a) der kleinen ribosomalen Untereinheit, (b) Ü I, (c) der großen ribosomalen Untereinheit und (d) Ü II.

Während die 4o S-ribosomale Untereinheit hauptsächlich drei Proteingruppen mit Molekulargewichten von 21 ooo, 23 ooo und 25 ooo Dalton enthält (Abb.12 a), besitzt das kleinere RNP des RNP-Überstands (Ü I) neben einer Gruppe kleinmolekularer Proteine mit Molekulargewichten zwischen 2o ooo und 24 ooo Dalton auch Proteine mit größeren Molekulargewichten (im Bereich zwischen 45 ooo und 16o ooo Dalton), von denen drei Gruppen mit Molekulargewichten von 65 ooo, 9o ooo und 13o ooo Dalton besonders herausragend sind (Abb.12 b). Diese Proteingruppen sind verschieden von denen, die man aus der größeren RNP-Fraktion (Ü II) isolieren kann (Abb.12 d): neben dem Hauptanteil von kleinmolekularen Proteinen zwischen 2o ooo und 25 ooo Dalton, die nicht weiter aufgetrennt werden konnten, da der hier verwendete Gelgradient nur für eine gute Auftrennung im Bereich höherer Molekulargewichte geeignet war, befinden sich dort außerdem noch Proteingruppen mit Molekulargewichten von 36 ooo bis 39 ooo Dalton und etwa 8o ooo Dalton. Ein Vergleich mit den Proteinen aus der großen ribosomalen Untereinheit des Cytoplasmas (Abb.12 c) zeigt, daß diese hochmolekularen Proteingruppen dort fehlen; diese enthalten nur Proteingruppen mit Molekulargewichten von 19 ooo, 23 ooo und 27 ooo Dalton.
Diese Ergebnisse zeigen, daß die RNP-Partikel des Kern-RNP-Überstands eine ähnliche Proteinzusammensetzung besitzen wie die cytoplasmatischen ribosomalen Untereinheiten und deshalb, und auf Grund der Ergebnisse der RNA-Untersuchungen, als deren Vorstufen angesehen werden können.

4.2. Die Untersuchung des RNP-Pellets

Da sich im RNP-Überstand weder ein RNP-Partikel, noch eine RNA-Klasse mit signifikantem Unterschied zwischen X/Y und X/O auffinden ließ, konnte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß sich in dieser Fraktion RNP-Material der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen befindet. Deshalb wurde das RNP-Pellet untersucht, das man nach der Zentrifugation des Kernhomogenats erhält.

Das (nochmals homogenisierte) RNP-Pellet liefert nach Auftrennung in 5-5o %igen Saccharose-Gradienten ein Radioaktivitätsprofil wie in Abb.13 dargestellt.

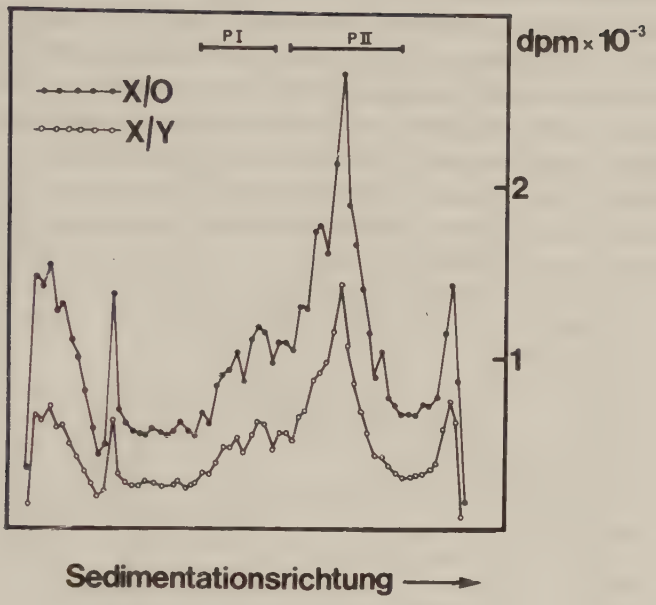


Abbildung 13 : Auftrennung des RNP-Pellets aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen in einem 5-5o %igen Saccharose-Gradienten. Die Kurve gibt die Radioaktivitätsverteilung der markierten RNA wieder.

Ein Vergleich mit Abb.7 (RNP-Überstand) zeigt, daß sich im RNP-Pellet-Gradienten im Wesentlichen RNP-Partikel befinden, die ein gleiches Sedimentationsverhalten besitzen wie die RNPs im Gradienten des RNP-Überstands: es treten zwei RNP-Klassen mit S-Werten von ca. 4o S (= P I) und 6o-9o S (= P II) auf, jedoch in sehr viel geringerer Menge als im RNP-Überstand. Vermutlich stellen sie eine Kontamination aus dem RNP-Überstand dar, weil eine differentielle Zentrifugation, wie sie hier durchgeführt wurde, nur eine Anreicherung, aber keine 1oo %ige Trennung von Partikeln unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens erlaubt.

4.2.1. Die RNA des RNP-Pellets

Um herauszufinden, ob es Unterschiede in der RNA des RNP-Pellets aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen gibt, wurde die gesamte RNP-Pellet-RNA, die ca. 3o % der markierten Spermatocytenkern-RNA ausmacht, auf poly(U)-Sepharose-Säulen aufgetrennt:
13-15 % der RNP-Pellet-RNA sind poly(A)-haltig und stellen eine RNA-Population heterogener Größe dar, deren Molekulargewichte zwischen $1o^5$ und mehr als $4 \times 1o^6$ Dalton liegen, wobei der größte Teil der radioaktiv-markierten RNAs Molekulargewichte von mehr als $o.8 \times 1o^6$ Dalton besitzt (Abb.14).

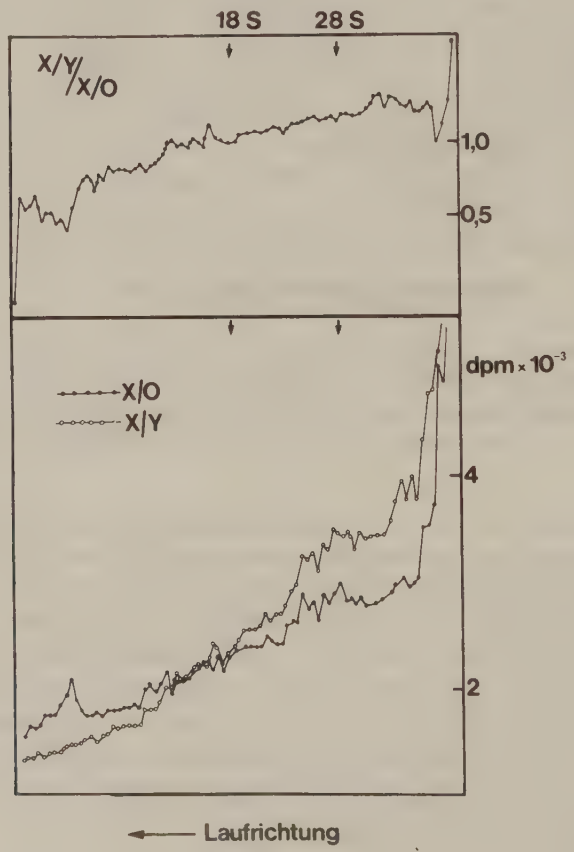


Abbildung 14 : Elektrophoretische Auftrennung der poly(A)$^+$-RNA des RNP-Pellets aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen.

Auffallend ist der Verlauf der $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurve: er ist gekennzeichnet durch ein starkes Abfallen im Bereich kleiner werdender Molekulargewichte, d.h., hochmolekulare RNA ist in dieser Fraktion im X/Y-Genotyp im Vergleich zum X/O-Genotyp angereichert. Signifikante Unterschiede in einzelnen RNA-Klassen, die auf eine am Y-Chromosom transkribierte RNA hinweisen, treten auch hier nicht auf.
Die poly(A)$^-$-Fraktion (Abb.15) enthält überwiegend prä-ribosomale RNAs (1.5 und 2.6 x 10^6 Dalton), die einer RNA-Population heterogener Größe (vergleichbar der poly(A)$^+$-RNA, s.Abb.14) überlagert sind und die sich hauptsächlich in den im Saccharose-Gradienten sedimentierenden RNP-Fraktionen (P I und P II) befinden (Ergebnis nicht aufgeführt).

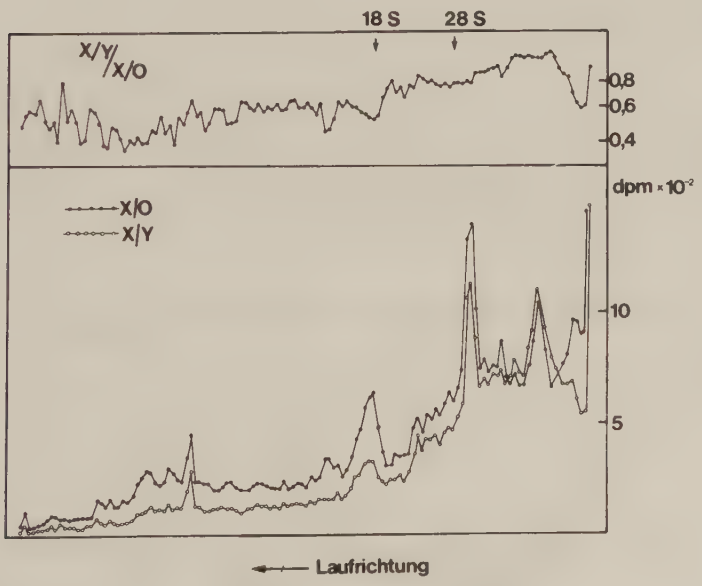


Abbildung 15 : Elektrophoretische Auftrennung der poly(A)$^-$-RNA des RNP-Pellets aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen.

Es konnte jedoch im Saccharose-Gradienten keine RNP-Fraktion gefunden werden, die hochmolekulare, heterogene poly(A)$^+$-RNA (s.Abb.14) enthielt. Auch war die Summe der gesamten Radioaktivität im Gradienten nur ein kleiner Teil dessen, was als Probe auf den Gradienten gegeben worden war. Dies führte zu dem Schluß, daß sich ein erheblicher Teil des RNP-Pellets nicht im Gradienten befindet, sondern auf den Boden des Zentrifugenröhrchens pelletiert.

4.2.2. Die Proteine des RNP-Pellets

Wie Kloetzel(1979) zeigen konnte, befinden sich im RNP-Pellet hauptsächlich die Proteine, die in Abhängigkeit von der Ausfaltung der Lampenbürstenschleifen in den Spermatocytenkernen akkumuliert werden, wobei die Proteingruppe mit einem Molekulargewicht von 66 ooo Dalton besonders stark angereichert wird.
Trennt man jedoch die Proteine aus P I und P II auf, so findet man, daß diese Proteingruppe keineswegs angereichert ist, möglicherweise sogar vollständig fehlt (Abb.16). Auch dies Ergebnis ließ vermuten, daß ein großer Teil des RNP-Pellets unter den hier gewählten Zentrifugationsbedingungen pelletiert.
Die Untersuchungsergebnisse dieses Materials, das RNP-PP genannt wurde, sind im folgenden Kapitel aufgeführt.

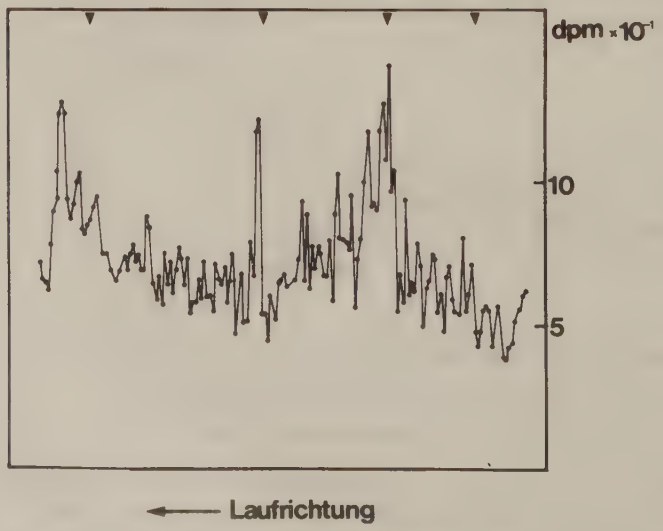


Abbildung 16 : Elektrophoretische Auftrennung der Proteine aus P I und P II des RNP-Pellets.

4.3. Die Untersuchung des RNP-PP

Die Untersuchungen des RNP-Pellets der Spermatocytenkerne hatte gezeigt, daß sich in dieser Fraktion ein großer Anteil an hnRNA (= heterogene, nukleäre RNA) befindet, die im X/Y-Genotyp im hochmolekularen Bereich angereichert ist verglichen mit der gleichen RNA aus X/O-Spermatocytenkernen (vergl. Abb.14). Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen des Saccharose-Gradienten (Abb.13) führte zu dem Ergebnis, daß sich diese RNA weder in P I und P II, noch an einer anderen Stelle im Gradienten befindet. Deshalb wurde das durch den Saccharose-Gradienten pelletierende Material (= RNP-PP) analysiert.
Unter den angegebenen Zentrifugationsbedingungen sedimentieren ca. 64 % der eingesetzten radioaktiv-markierten RNA des RNP-Pellets als RNP-Komplex auf den Boden des Zentrifugenröhrchens, was nur für Partikel mit Sedimentationskoeffizienten von >18o S zutrifft. Wie Kloetzel (1979) zeigen konnte, pelletieren diese Partikel noch unter Bedingungen, unter denen nur RNPs von mehr als 9oo S den Röhrchenboden erreichen. Das jedoch bedeutet, daß es sich bei diesem Material um RNPs handeln muß, die in einem stark aggregierten Zustand vorkommen, der jedoch nicht auf Disulfidbrückenbildung beruht: Zugabe von Mercaptoäthanol auch im Gradienten (und nicht nur in der Probe) führt zum gleichen Ergebnis.

4.3.1. Die RNA des RNP-PP

Die RNP-PP-RNA unterscheidet sich durch mehrere Eigenschaften von allen anderen untersuchten Fraktionen der larvalen Hodenanlagen:
1. Mit 24-26 % poly(A)-haltiger RNA stellt das RNP-PP die Fraktion mit dem höchsten Anteil an polyadenylierter RNA dar. Ein Vergleich mit den anderen Fraktionen zeigt die Tabelle 2:

Fraktion	% poly(A)$^+$-RNA
Cytoplasma	9
RNP-Überstand	6
RNP-Pellet	14
RNP-PP	25

Tabelle 2 : Prozentualer Anteil an markierter poly(A)$^+$-RNA in den verschiedenen Fraktionen der larvalen Hodenanlagen.

Die in der Tabelle 2 aufgeführten Werte beziehen sich auf den prozentualen Anteil der innerhalb von 24 Stunden markierten RNA und geben keine Auskunft über die Gesamtmenge der in den Fraktionen enthaltenen poly(A)$^+$-RNA.

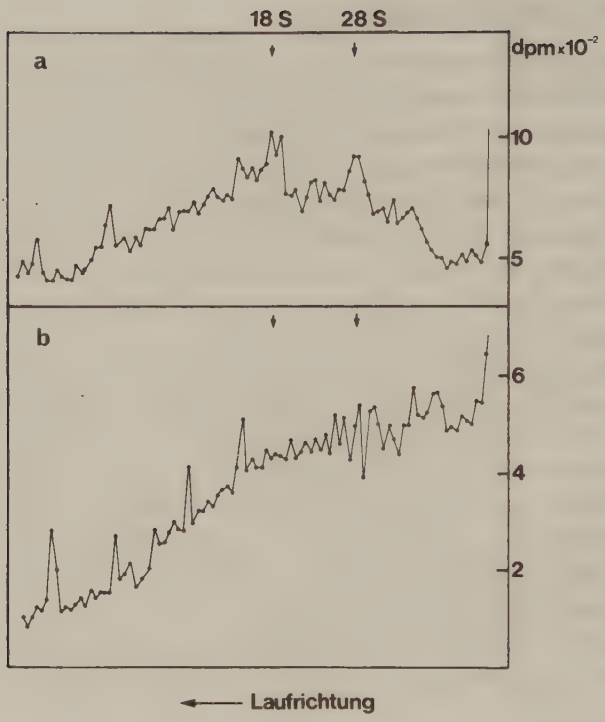


Abbildung 17: Elektrophoretische Auftrennung der poly(A)$^-$- (a) und poly(A)$^+$-RNA (b) des RNP-PP.

2. Wie die Abb. 17 b zeigt, enthält die poly(A)-haltige Fraktion der RNP-PP-RNA hochmolekulare RNA heterogener Größe (hnRNA) mit Molekulargewichten zwischen $1o^5$ und $> 4 \times 1o^6$ Dalton. Weder im RNP-Überstand (vergl. Abb. 8,9) noch im Cytoplasma (Abb.4,5) ist der Anteil an hochmolekularer RNA so groß wie im RNP-PP.
Ein Vergleich dieses RNA-Profils mit dem der poly(A)$^+$-RNA aus dem gesamten RNP-Pellet (Abb. 14) läßt erkennen, daß sich im RNP-PP der größte Teil der gesuchten hnRNA des RNP-Pellets befindet.

Außerdem enthält das RNP-PP poly(A)$^-$-RNA heterogener Größe mit nur geringen Mengen an prä-ribosomaler RNA (Abb. 17 a). RNA mit Molekulargewichten von mehr als $1.4 \times 1o^6$ Dalton kommt in

wesentlich geringeren Mengen vor als in der poly(A)$^+$-RNA dieser Fraktion; der größte Teil der RNA liegt in einem Molekulargewichtsbereich zwischen o.5 und 1.4 x $1o^6$ Dalton.

3. Die durchschnittlichen $^{14}C/^3H$-Werte aller Fraktionen, die in einem Doppelmarkierungsexperiment aus X/Y- und X/O-Hodenanlagen isoliert werden, sind in Tab. 3 zusammengestellt:

Fraktion	$^{14}C/^3H$ (= X/Y : X/O)
"Cytoplasma"	o.2
RNP-Überstand	o.5
RNP-PP	o.7

Tabelle 3: Durchschnittliche $^{14}C/^3H$-Werte der bei der Isolation des RNP-PP von X/Y- und X/O-Hodenanlagen anfallenden Fraktionen.

Dabei zeichnet sich das RNP-PP durch das größte $^{14}C/^3H$-Verhältnis aus, d.h., es findet im X/Y-Genotyp in dieser Fraktion eine Anreicherung von RNA statt im Vergleich zur gleichen Fraktion aus X/O-Spermatocytenkernen.
Von Kloetzel (1979) wurde ein vergleichbares Verhalten der $^{14}C/^3H$-Verhältnisse der Proteine in den oben genannten Fraktionen beschrieben, so daß daraus der Schluß gezogen werden kann, daß das Material im RNP-PP in Abhängigkeit von des Anwesenheit des Y-Chromosoms in den Spermatocytenkernen akkumuliert wird.

4. Der Verlauf der $^{14}C/^3H$-Verhältniskurve der poly(A)$^+$-RNP-PP-RNA ist charakterisiert durch ein starkes Abfallen im Bereich niedermolekularer RNA, d.h., verglichen mit der X/O-RNA ist im RNP-PP hochmolekulare RNA angereichert. Ein signifikanter Unterschied in einzelnen RNA-Fraktionen ist nicht vorhanden (Abb. 18 a).
Ein derart starkes Absinken der $^{14}C/^3H$-Verhältniskurve wurde in keiner anderen Fraktion beobachtet: im RNP-Überstand findet man nur eine geringe Steigung zum hochmolekularen Bereich hin (Abb.8,9), während im "Cytoplasma" keine bzw. nur ganz geringe Unterschiede zwischen dem durchschnittlichen $^{14}C/^3H$-Verhältnis im nieder- und hochmolekularen Bereich vorkommen (Abb. 4,5).

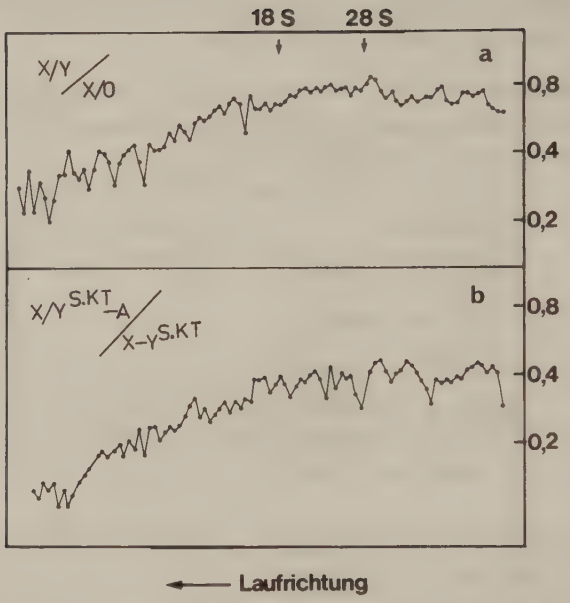


Abbildung 18 : $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurven aus den Vergleichen der RNP-PP-RNA von Männchen verschiedener Genotypen.

5. Es wurde weiterhin geprüft, ob lediglich die Anwesenheit des Y-Chromosoms genügt, um hochmolekulare RNA anzureichern, oder aber ob die Ausfaltung der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen dafür verantwortlich ist.
Hierzu wurde die RNP-PP-RNA aus Männchen, die nur ein Y-Fragment mit Schlingen, Keulen und Tubuli ($X/Y^{S.KT}$-A(3)) besitzen, isoliert und in Doppelmarkierungsexperimenten mit der RNA aus Männchen mit dem gleichen Y-Fragment, dessen Schleifenausfaltung aber unterdrückt ist ($Y^{S.KT}$-X), verglichen (Abb.18 b).
Die $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurve zeigt einen ähnlichen Verlauf wie beim Vergleich von X/Y- und X/O-RNP-PP-RNA (Abb. 18 a): in Anwesenheit der Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms (entweder aller Schleifen oder nur der Schleifen von einem Y-Fragment) findet eine relative

Anreicherung hochmolekularer RNA statt, erkenntlich am Anstieg der $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurve im hochmolekularen Bereich.
Das bedeutet, daß das Y-Chromosom allein nicht genügt, damit eine Akkumulation hochmolekularer RNA im RNP-PP stattfindet, sondern erst die Ausfaltung der Lampenbürstenschleifen hat eine Anreicherung dieser RNA zur Folge. Isotopeneffekte können hierbei ausgeschlossen werden, da der Verlauf der $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurven unabhängig ist von der Art des Isotops, mit dem die Hodenanlagen eines Genotyps markiert wurden.

4.3.2. Die Proteine des RNP-PP

Die im RNP-PP gefundene RNA ist assoziiert mit einer Anzahl von Proteinen, deren Hauptanteil eine Proteingruppe mit einem Molekulargewicht von 66 ooo Dalton und 72 ooo Dalton ausmacht. Es handelt sich hierbei um Proteine, die in keiner anderen der hier beschriebenen Fraktionen auftreten und die in Abhängigkeit von der Ausfaltung der Lampenbürstenschleifen angereichert werden, wobei besonders die 66 ooo Dalton-Proteine im X/O-Genotyp in ihrer Menge reduziert sind (Kloetzel, 1979).

4.3.3. Isolation des RNP-PP nach Behandlung des RNP-Pellets mit RNase T_1

Nähere Auskünfte über die Struktur der im RNP-PP vorhandenen Partikel sollte durch milde RNase-Behandlung gewonnen werden.
Bei Behandlung des RNP-Pellets mit RNase T_1 sedimentieren nur noch ca. 14 % der radioaktiv-markierten RNA als RNP-PP auf den Röhrchenboden (verglichen mit 64 % unter Normalbedingungen). Der größte Teil der RNPs im Gradienten wird durch RNase-Behandlung zerstört und die hydrolysierte RNA befindet sich oben auf dem Gradienten (Abb.19; im Vergleich dazu Abb. 13 ohne RNase-Behandlung). Die noch im RNP-PP vorhandene RNA ist nicht mehr hochmolekular, sondern setzt sich aus zwei Größenklassen zusammen, eine von 8o-12o und die zweite von 2oo-3oo Nukleotiden (Abb. 2oa).
Es kann ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um doppelsträngige RNA-Sequenzen handelt, die ebenfalls nicht durch RNase T_1 hydrolysiert werden: Behandlung der RNP-PP-RNA nach Entfernen der Proteine (durch Proteinase K und Zentrifugation durch CsCl) bewirkt eine fast voll-

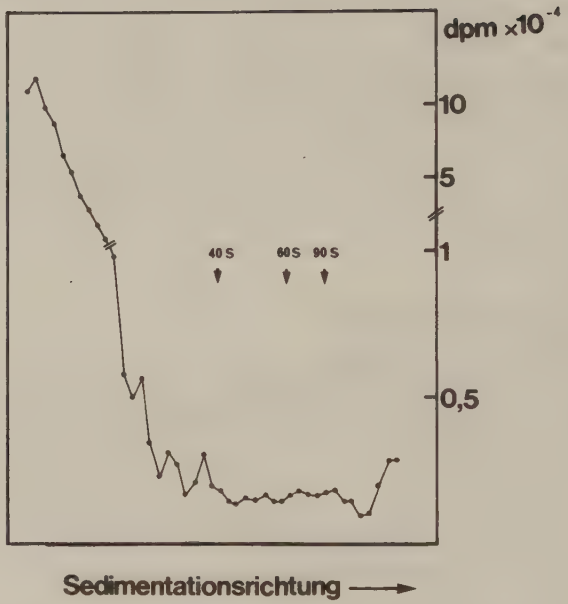


Abbildung 19 : Auftrennung des RNP-Pellets nach Behandlung mit RNase T_1 (4 µg/ml) in einem 5-5o %igen Saccharose-Gradienten.

ständige Hydrolyse der RNA (Abb. 2o b).
Wie Kloetzel (1979) zeigen konnte, befinden sich nach RNase T_1-Behandlung noch 45 % der markierten Proteine im RNP-PP (gegenüber 8o % im Kontrollexperiment), wobei die 66 ooo Dalton-Proteine stark angereichert sind. Das bedeutet,daß die im RNP-PP nach RNase T_1-Behandlung vorhandenen RNA-Sequenzen durch Proteine, besonders durch 66 ooo Dalton-Proteine, vor Hydrolyse geschützt werden.
Auch im RNP-PP aus X/O-Spermatocytenkernen treten die gleichen RNase-stabilen RNA-Fragmentklassen auf (Abb. 2o a). Daraus läßt sich schließen, daß es innerhalb dieser RNP-Partikel (sowohl in X/Y als auch in X/O) Bereiche gibt, in denen die RNA vollständig und fest mit Proteinen umgeben ist, während der größte Teil der RNA durch RNase hydrolysiert werden kann, d.h. nur locker mit Proteinen umgeben ist.

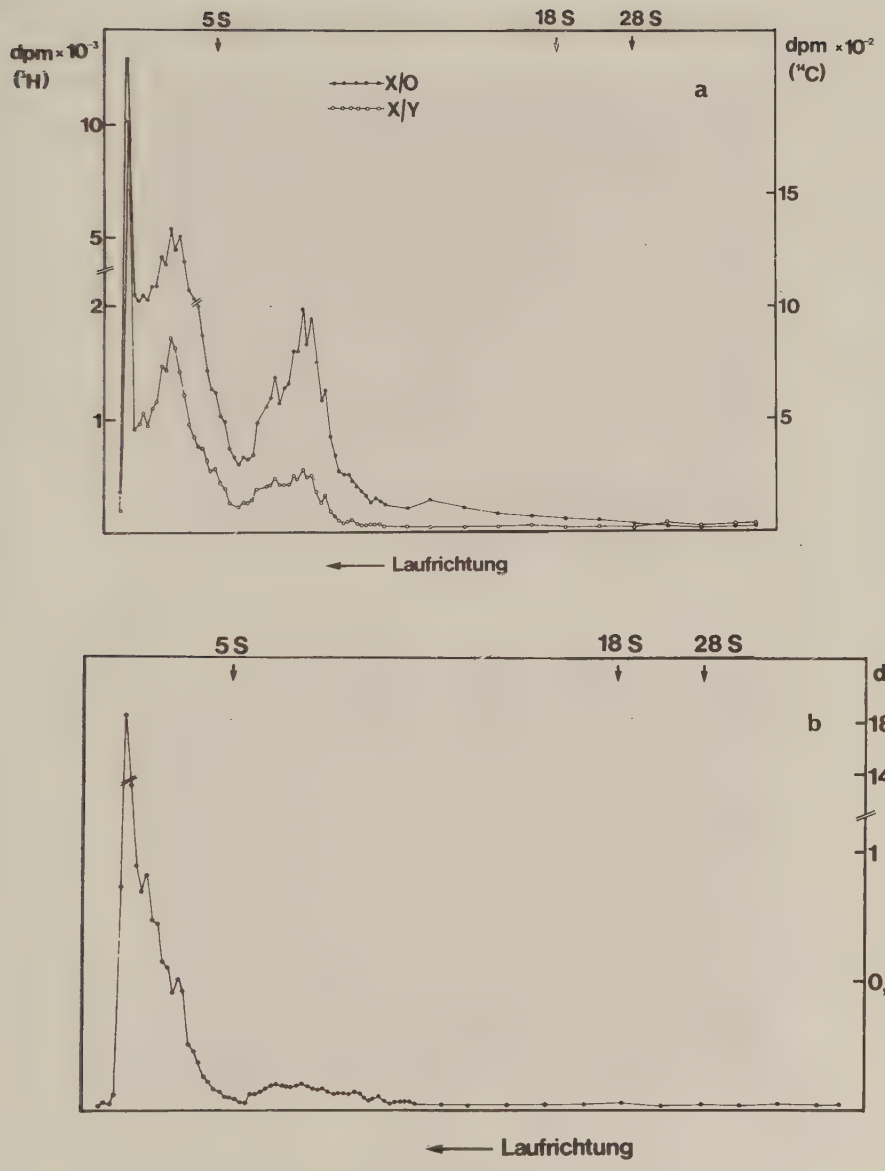


Abbildung 2o : Elektrophoretische Auftrennung der RNP-PP-RNA

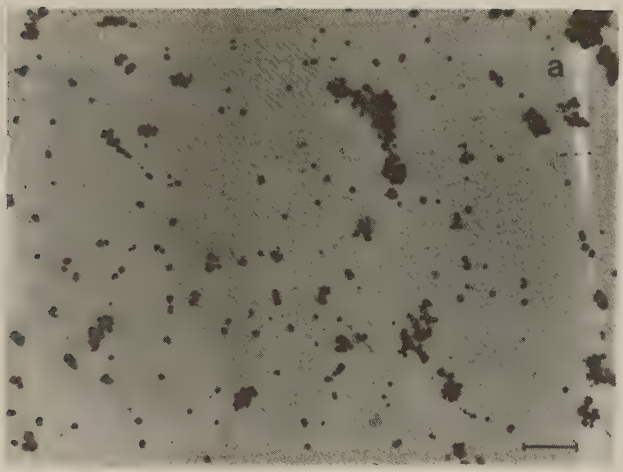
a) nach Behandlung des RNP-Pellets mit RNase T_1

b) nach Behandlung der deproteinisierten RNA des RNP-PP mit RNase T_1

4.3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchung des RNP-PP

Elektronenmikroskopische Untersuchungen des RNP-PP sollten weitere Aufschlüsse über die Ultrastruktur dieser RNP-Partikel geben.

Dabei konnte man durch verschiedene Behandlungen ein recht vollständiges Bild dieser RNP-Partikel erhalten (Abb. 21 a-f):
Im unbehandelten Präparat (Abb. 21 a,b) sind auffällig große Aggregate von RNP-Partikeln enthalten, die Durchmesser von mehr als 2oo nm besitzen können und die den hohen S-Wert (> 9oo S) des RNP-PP erklären können. Diese setzen sich zusammen aus globulären Partikeln (= G-Partikel) variierenden Durchmessers, der von 6o-12o nm reichen kann. Die Feinstruktur dieser G-Partikel wird besonders deutlich bei Denaturierung der Proteine des RNP-PP mit 8 M Harnstoff: dies bewirkt eine Auflösung der G-Partikel in kleine, 2o-3o nm Subpartikel (=S-Partikel) (Abb. 21 c), die sich im weiteren Verlauf der Denaturierung völlig aus dem Komplex lösen und als freie Monomere in der Präparation aufzufinden sind (Abb. 21 d).
Die 2o nm-Subpartikel werden vermutlich durch RNA-Moleküle zusammengehalten, wodurch eine geordnete, fadenförmige, manchmal perlschnurartige Anordnung der S-Partikel zustande kommt (Abb.21 c,d). Diese Vermutung wird durch RNase-Behandlung des RNP-PP unterstützt: dabei zerfallen die zuvor "aufgereihten" Partikel in Monomere, die an einigen Stellen noch zu Oligomeren (Di-, Tri- und Tetramere) zusammengehalten werden. (Abb. 21 e). Es ist möglich, daß sich innerhalb dieser S-Partikel RNA-Sequenzen befinden, die durch Proteine vor der RNase-Einwirkung geschützt sind. Die Existenz solcher Protein-geschützter RNA-Sequenzen wurde in Kapitel 4.3.3. dargestellt.
Weiterhin erkennt man, besonders in schräg bedampften Präparaten, lange, gestreckte RNA-Moleküle zwischen den G-Partikeln, die eine Länge von mehr als 1o µm erreichen können (Abb. 21 f), was einem Molekulargewicht von mehr als $1o^7$ Dalton entspricht, ein Ergebnis, das in guter Übereinstimmung mit den Daten der RNA-Untersuchungen steht (s. Kapitel 4.3.1.).
In Abb. 22 ist an Hand dieser Ergebnisse ein Modell zum Aufbau dieser RNP-Partikel entworfen worden.



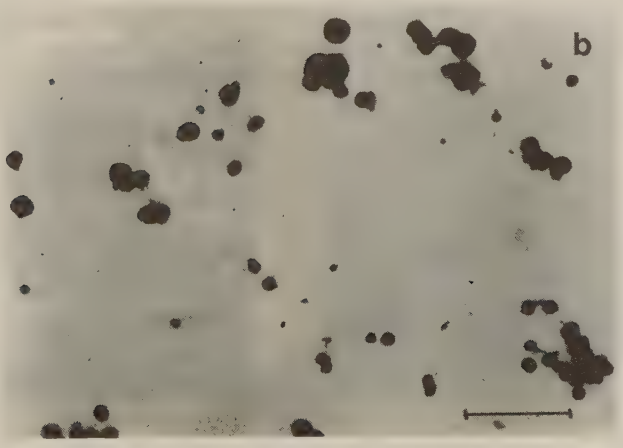


Abbildung 21 a,b : Elektronenmikroskopische Aufnahmen des RNP-PP
Der Strich entspricht der Länge von 1 µm

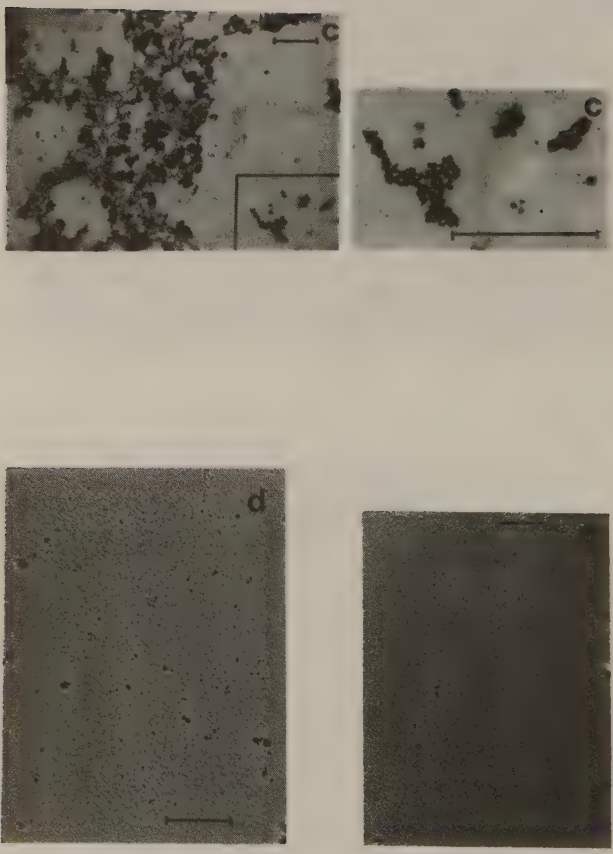


Abbildung 21 c,d,e : Elektronenmikroskopische Aufnahmen des RNP-pp nach Behandlung mit 8 M Harnstoff (c,d) und o.5 µg/ml RNase T_1 (e). Der Strich entspricht einer Länge von 1 µm.

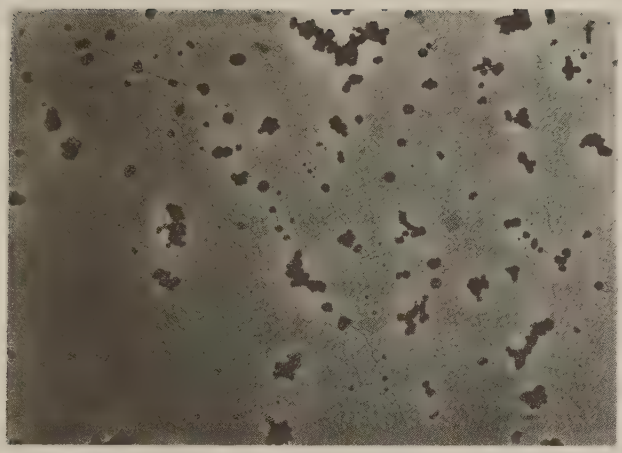


Abbildung 21 f : Elektronenmikroskopische Aufnahme des RNP-PP . Das Präparat wurde mit Gold-Palladium rotationsbedampft. Der Strich entspricht einer Länge von 1 µm

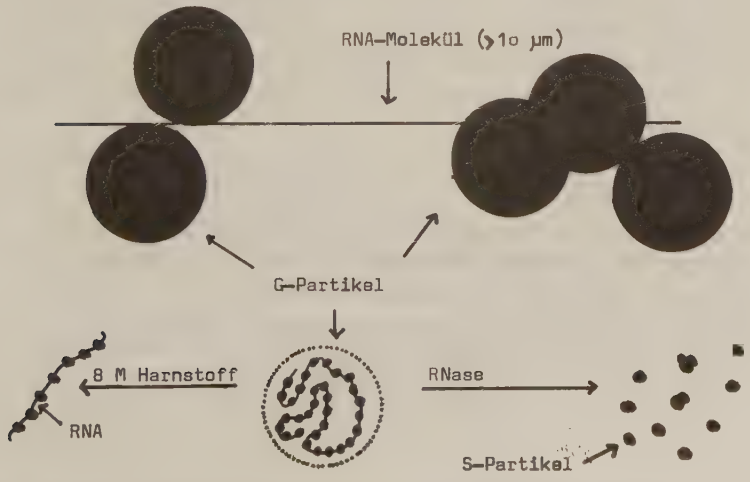


Abbildung 22 : Schematisches Modell zum Aufbau der RNP-Partikel des RNP-PP.

5. Filterhybridisierung der RNP-PP-RNA

Sowohl die RNA-Untersuchungen, als auch die Ergebnisse der Protein-Untersuchungen (Kloetzel, 1979) deuten darauf hin, daß sich im RNP-PP RNP-Material befindet, das in Anwesenheit der Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms angereichert wird. Ferner konnte kein qualitativer Unterschied zwischen der RNP-PP-RNA aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen gefunden werden.

Um herauszufinden, ob sich innerhalb der heterogenen RNA-Population des RNP-PP, besonders im hochmolekularen Bereich, Y-chromosomal codierte Sequenzen befinden, die wiederum heterogen in ihrer Größe sind und deshalb keine $^{14}C/^{3}H$-Verhältnis-peaks hervorrufen, wurde die RNP-PP-RNA sowohl aus X/Y- als auch aus X/O-Hodenanlagen auf DNA mit unterschiedlichem Y-Anteil hybridisiert, und zwar wurde DNA aus Wildtyp-Weibchen (X/X), aus Wildtyp-Männchen (X/Y) und aus Männchen des Stammes 7o3/33 (X-3/Y/Y) verwendet.

Es war nicht bekannt, ob im Bereich der Sättigung hybridisiert wurde, weil keine Sättigungskurve ermittelt worden war. Deshalb können keine Angaben darüber gemacht werden, wie viele komplementäre DNA-Sequenzen für die RNP-PP-RNA pro Genom vorhanden sind.

Zur Auswertung der Versuche wurden die gebundenen dpm pro Genom errechnet. Als Grundlage dieser Berechnung dienten die Werte von Mulder et al. (1965), der für die X/Y-Männchen einen Wert von o.48 pg DNA/2n bestimmte, von dem 9 % auf das Y-Chromosom entfallen (Hennig et al., 1973). Daraus ergeben sich dann die Werte für die Weibchen von o.52 pg/2n und für die Männchen des Stammes 7o3/33 von o.48 pg/2n.

Um die Ergebnisse mehrerer Versuchsserien miteinander vergleichen zu können, wurden (nach Abzug der "background"-Hybridisierung), die für die Wildtyp-Weibchen bestimmten Hybridisierungswerte gleich eins gesetzt und die Hybridisierungswerte für die Wildtyp-Männchen und die 7o3/33-Männchen in Relation dazu berechnet. Die Werte dieser "relativen Hybridisierung" sind in Tabelle 4 dargestellt.

DNA	relative Hybridisierung der RNP-PP-RNA aus	
	X/Y	X/O
X/X	1	1
X/Y	3.7 ± 0.76	3.5 ± 0.53
X-3/Y/Y	7.1 ± 1.1	6.5 ± 1.8

Tabelle 4: Relative Hybridisierung der X/Y- und X/O-RNP-PP-RNA an DNA mit unterschiedlichem Y-Chromosom-Anteil (Erklärung siehe Text).

Eine graphische Darstellung dieser Daten veranschaulicht die daraus resultierenden Schlußfolgerungen (Abb. 23):

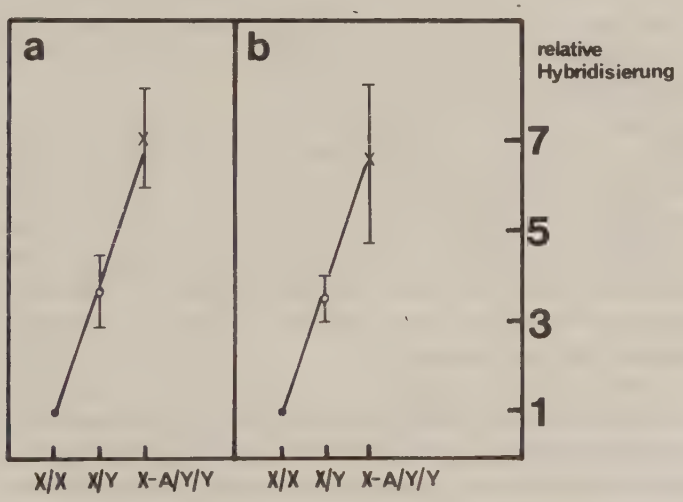


Abbildung 23: Relative Hybridisierung von RNP-PP-RNA aus X/Y-(a) und X/O- (b) Spermatocytenkernen auf DNA mit unterschiedlichem Y-Chromosom-Gehalt. (Erklärung siehe Text).

1. Hybridisiert man die RNP-PP-RNA aus Wildtyp-Männchen auf DNA mit unterschiedlichem Y-Chromosom-Gehalt, so findet man den geringsten Anteil an komplementären Sequenzen in der DNA von Weibchen (X/X), einen signifikant höheren Wert in der DNA der Männchen des Wildtyps (X/Y) und einen noch höheren Wert in der DNA von Männchen mit zwei Y-Chromosomen (X-3/Y/Y).
2. Aus der graphischen Darstellung wird ersichtlich, daß ein linearer Zusammenhang zwischen diesen Werten besteht: der Anteil der hybridisierten RNA wächst proportional zum Gehalt der Y-chromosomalen DNA (Abb.23 a).
3. Führt man das Experiment mit RNA durch, die aus dem RNP-PP von X/O-Spermatocytenkernen gewonnen wurde, und wertet die Daten entsprechend aus, (Tab. 4 Spalte 2 und Abb. 23b), so kann man hier folgende Aussagen machen:
a) es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Gehalt Y-chromosomaler DNA und der Menge der hybridisierten RNA, und
b) innerhalb der berechneten Fehlergrenzen liegen die Hybridisierungswerte der X/O-RNA auf der gleichen Geraden, die für die X/Y-RNA ermittelt worden ist.
Das bedeutet, daß im RNP-PP RNA-Sequenzen angereichert sind, die mit DNA-Sequenzen des Y-Chromosoms vermehrt hybridisieren. Die naheliegende Schlußfolgerung, daß in dieser Fraktion Transkripte des Y-Chromosoms angereichert sind, konnte durch das Kontrollexperiment - Hybridisierung mit RNP-PP-RNA aus X/O-Spermatocytenkernen - ausgeschlossen werden: auch diese RNA-Fraktion, die nur Transkripte der Autosomen und des X-Chromosoms enthält, hybridisiert bevorzugt mit Sequenzen des Y-Chromosoms.
Das heißt, daß mit dem RNP-PP eine Fraktion isoliert werden konnte, in der RNA-Sequenzen angereichert sind, die auf den Autosomen und dem X-Chromosom codiert sind (und deshalb auch aus X/O-Hodenanlagen isoliert werden können), aber vermehrt an Y-chromosomaler DNA hybridisieren können.
Ob die RNP-PP-RNA aus X/Y-Spermatocyten zusätzlich geringe Mengen an Transkripten des Y-Chromosoms enthält, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

6. In-situ Hybridisierungen

Die aufgeführten Daten zeigen, daß das RNP-PP in Gegenwart der Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms akkumuliert wird; jedoch war die Frage offen, ob die Schleifen lediglich regulierend auf die Akkumulation wirken, oder aber ob sie selbst die Orte im Zellkern sind, an denen die hnRNPs des RNP-PP gespeichert werden und das RNP-PP damit Material der Schleifenmatrix darstellt. Dann sollte die akkumulierte RNA in zahlreichen Kopien in der Matrix vorliegen, so daß eine in-situ Hybridisierung mit komplementärer DNA auf Grund der lokalen Häufigkeit der RNA-Sequenzen möglich sein sollte. (Eine ähnliche Situation findet man in den polytänen Chromosomen, wo viele identische DNA-Sequenzen gehäuft an einer Stelle vorkommen).
Eine solche Methode wurde von Pukkila (1975) beschrieben, die markierte 5 S-DNA an nascierende 5 S-RNA-Transkripte in Oocyten-Lampenbürstenschleifen von Triturus hybridisierte.
Hier sollte die in-situ Hybridisierung mit radioaktiv-markierter cDNA, die komplementär zur RNP-PP-RNA war, durchgeführt werden.

Da es bei Drosophila jedoch nicht möglich ist, Präparate von isolierten Lampenbürstenchromosomen herzustellen, wurden Quetschpräparate von ganzen Spermatocytenkernen angefertigt. Es war jedoch ungewiß, ob die cDNA überhaupt die Kernmembran passieren konnte, um an den Ort ihrer komplementären Sequenzen zu gelangen. Deshalb wurden Testhybridisierungen mit cDNA von 38 S-rRNA durchgeführt.

6.1. cDNA-Synthese

Als Matrize für die cDNA-Synthese diente poly(A)$^+$-RNP-PP-RNA und für die Testhybridisierungen 38 S-rRNA (diese Bezeichnung steht für den Precursor der ribosomalen RNA, der ein Molekulargewicht von 2.6×10^6 Dalton besitzt und gibt nicht den wirklichen S-Wert an). Diese kann, obwohl nicht polyadenyliert, auf Grund hoher Sekundärstruktur revers transkribiert werden (Lubsen, pers.Mitt.).

Nach Beendigung der Reaktion wurde die cDNA von nicht-eingebauten Triphosphaten auf einer Sephadex G-75 Säule getrennt (Abb. 24).

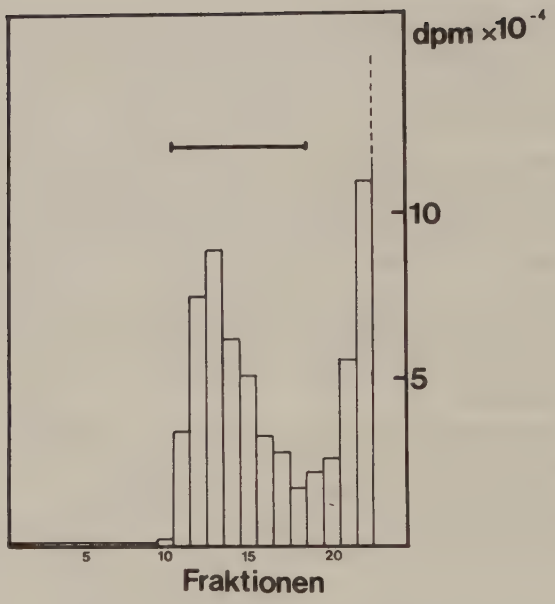


Abbildung 24 : Ausschlußchromatographie der ^{3}H-markierten cDNA auf einer Sephadex G-75 Säule.
Der Balken markiert die für die in-situ Hybridisierungen verwendeten Fraktionen.

Über die im Ausschluß eluierte Radioaktivität konnte die Effizienz der Reaktion berechnet werden, indem man von einer durchschnittlichen spezifischen Aktivität der ^{3}H-desoxy-Triphosphate ausging: sie betrug etwa 5 %.
Im Gegensatz dazu ist die poly(A)$^{-}$-RNP-PP-RNA, die zur Kontrolle revers transkribiert wurde, eine sehr schlechte Matrize.

6.2. In-situ Hybridisierungen mit 38 S-cDNA

In-situ Hybridisierungen an chromosomale RNA setzt voraus, daß diese RNA in zahlreichen Kopien an einer Stelle vorliegt. Diese Situation findet man im Nukleolus, wo die rRNA-Cistrons gleichzeitig in großer Zahl transkribiert werden; deshalb wurde die Testhybridisierung mit komplementärer DNA zur 38 S-rRNA durchgeführt.

Das Ergebnis dieser Hybridisierungen zeigt die Abb.25:

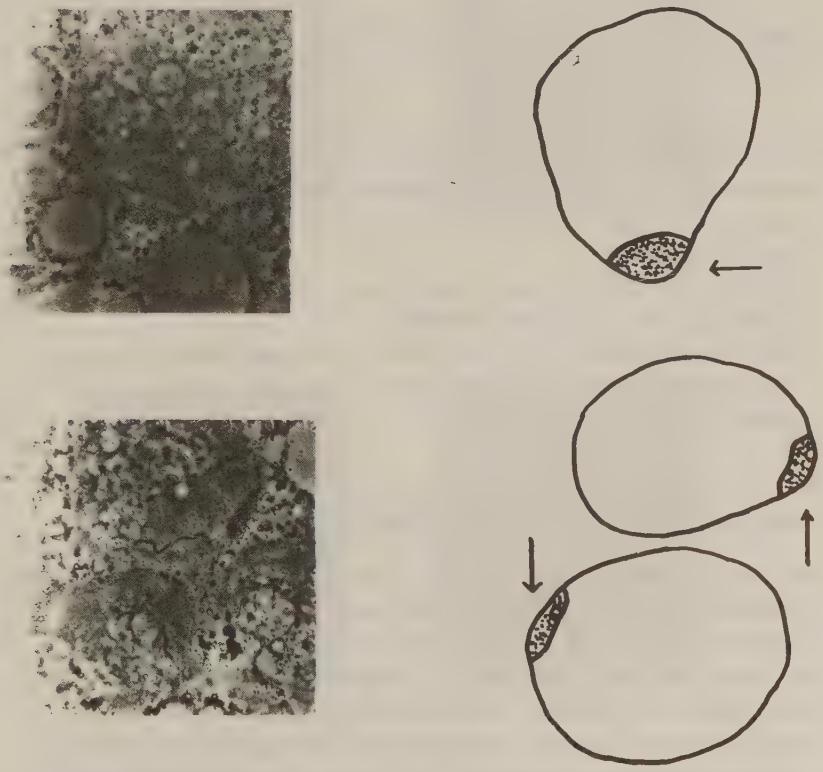


Abbildung 25 : In-situ Hybridisierung von 38 S-cDNA an die RNA der Spermatocytenkerne. Expositionszeit: 17 Tage. Der Pfeil markiert die Position des Nukleolus.

Das Auszählen der Silberkörner über den einzelnen Bereichen des Präparats führte zu folgendem Ergebnis (Tab.5):

Bereich	Anzahl der Silberkörner/Flächeneinheit
Cytoplasma	9 ± 1.1
Nukleolus	34 ± 1.6
extra-nukleolärer Bereich der Spermatocytenkerne	9 ± 1.3

Tabelle 5 : Anzahl der Silberkörner über den einzelnen Bereichen des Präparats bei Hybridisierung mit ^{3}H-markierter 38 S-cDNA.

Deutlich erkennt man eine Anhäufung von Silberkörnern über dem Nukleolus der Spermatocytenkerne; sie ist drei- bis viermal so hoch wie die "background"-Markierung und kann als signifikant betrachtet werden.
Die Markierung über dem restlichen Spermatocytenkern liegt nicht signifikant über der des "backgrounds".
Dies Versuchsergebnis zeigt, daß mit der hier beschriebenen Technik eine in-situ Hybridisierung an die RNA der Spermatocytenkerne möglich ist.

6.3. In-situ Hybridisierungen mit RNP-PP-cDNA

Bei der Anwendung dieser Methode zur Hybridisierung mit RNP-PP-cDNA kommen mehrere erschwerende Faktoren hinzu, wodurch die Hybridisierungsbedingungen nicht vergleichbar werden: 1. Es ist nichts über die Häufigkeit der RNA-Sequenzen am Chromosom bekannt. 2. Da die RNP-PP-RNA eine Population unterschiedlicher RNA-Moleküle darstellt, wird die Konzentration der komplementären cDNA-Sequenzen zu einer bestimmten RNA-Sequenz niedriger sein als bei Verwendung einer einheitlichen Matrizen-RNA (wie z.B. die 38 S-rRNA). Diese niedrigere cDNA-Konzentration sollte durch eine längere Hybridisierungsdauer

etwas ausgeglichen werden (62 Stunden gegenüber 24 Stunden für die 38 S-cDNA).

Die Ergebnisse der in situ-Hybridisierungen lassen sich wie folgt zusammenfassen (Abb.26):

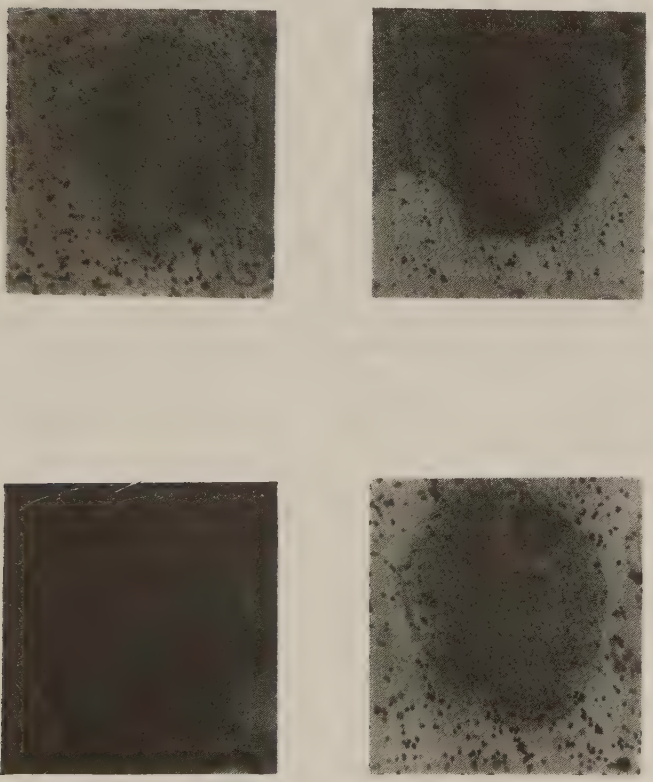


Abbildung 26 : In-situ Hybridisierungen der RNP-PP-cDNA an die RNA der Spermatocytenkerne. Expositionsdauer: 27 Tage

1. Die Markierung über den Kernen (34 ± 2 Silberkörner/Flächeneinheit) liegt mit etwa doppelt so vielen Silberkörnern signifikant über der "background"-Markierung (18 ± 4.8 Silberkörner/Flächeneinheit). Es handelt sich also um eine spezifische Hybridisierung an Kern-RNA.
2. Die "background"-Markierung war in allen untersuchten Präparaten (auch bei Hybridisierung mit 38 S-cDNA) sehr hoch. Selbst Zugabe von kalter Kalbsthymus-DNA im Überschuß und Waschen der Präparate in 2 x SSC bei 6o ^{o}C und in 1o % TCA zur Entfernung unspezifischer Hybridisierungen verringerte die "background"-Markierung nicht, ein Befund, der schon von Pukkila (1975) beschrieben wird.
3. Eine signifikante Markierung bestimmter Y-Lampenbürstenschleifen konnte nicht festgestellt werden. Gehäuft findet man Silberkörner um den Nukleolus herum und im proximalen Bereich der Schleifen. Markierungen über dem Nukleolus, dem Pseudonukleolus und den Fäden lagen nie über der des "backgrounds".
In-situ Hybridisierungen der RNP-PP cDNA an polytäne Chromosomen zur Lokalisation der Genorte dieser RNA auf den Chromosomen lieferte keine spezifische Markierung einzelner Loci (Ergebnis nicht aufgeführt). Da das RNP-PP eine heterogene RNA-Population enthält, werden bei der reversen Transkription viele verschiedene cDNA-Sequenzen hergestellt, die dann an sehr vielen Stellen der polytänen Chromosomen hybridisieren können.

IV. Diskussion

In den Kernen primärer Spermatocyten von Drosophila hydei bildet das Y-Chromosom besonders große Lampenbürstenschleifen aus, deren Matrix aus Ribonukleoproteinpartikeln besteht.

RNP-Partikel chromosomaler Herkunft konnten aus den Lampenbürstenschleifen von Triturus-Oocyten isoliert werden: sie enthalten nicht-ribosomale, hochmolekulare RNA, die mit etwa 2o nicht-basischen Proteinen assoziiert ist und so einen stabilen RNP-Komplex darstellt, der die RNA, zumindest teilweise, bis zur Translation in der Embryogenese konserviert (Sommerville und Malcolm, 1976; Malcolm und Sommerville, 1977).
Die Isolation von RNP-Partikeln der Lampenbürstenschleifen von D.hydei setzt eine Methode zur Anreicherung von Kernen primärer Spermatocyten voraus, weil es nicht möglich ist, diese RNPs aus den gesamten Hodenanlagen zu isolieren (Knust, 1975).
In der Literatur sind zahlreiche Methoden zur Kernisolation aus verschiedenen Geweben und aus Zellkulturen von Drosophila beschrieben worden (z.B. Boyd et al.,1968, für Speicheldrüsenkerne; Levis und Penman, 1977 , für Kerne aus Zellkulturen), die sich jedoch nicht ohne Weiteres auf die Isolierung von Spermatocytenkernen übertragen ließen: mit einem Durchmesser von 2o-4o µm stellen sie, verglichen mit somatischen Zellkernen, sehr große Organellen dar, die schon bei geringfügigen Änderungen des umgebenden Ionenmilieus geschädigt werden. Außerdem sind die Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms sehr empfindliche Strukturen, deren Morphologie schon bei etwas erhöhter mechanischer Beanspruchung (z.B. Zentrifugation bei zu hohen g-Zahlen) sofort geschädigt wird.
Mit der hier beschriebenen Methode war es erstmals möglich, trotz dieser Schwierigkeiten eine saubere Kernfraktion mit nur geringer cytoplasmatischer Kontamination zu bekommen, in der die Lampenbürstenschleifen, soweit lichtmikroskopisch erkennbar, relativ gut erhalten waren. Eine Kontamination mit anderen Kernen - Spermatogonienkerne, Kerne der Hodenhülle - kann nicht vollständig ausgeschlossen werden; soweit lichtmikroskopisch erkennbar, ist der Anteil an anderen Kernen jedoch sehr gering.

Vergleicht man die RNA in den Kernen primärer Spermatocyten aus X/Y- und X/O-Hodenanlagen in Doppelmarkierungsexperimenten, so findet man keine signifikanten $^{14}C/^{3}H$-Unterschiede (Ergebnis nicht aufgeführt). Da eventuell vorhandene geringe Unterschiede bei der Analyse der Gesamt-RNA verdeckt werden können „(besonders durch die Menge der prä-ribosomalen RNA), wurde eine weitere Fraktionierung der Kerne erforderlich. Aus den Untersuchungen von Hennig (1967) ist bekannt, daß die Matrix der Lampenbürstenschleifen aus Ribonukleoprotein-Partikeln besteht. Deshalb wurde eine Methode zur Anreicherung dieser RNP-Strukturen in einer Fraktion angestrebt.

Die hier verwendete Methode lieferte zwei RNP-Fraktionen, das RNP-Pellet und den RNP-Überstand, wobei im Pellet überwiegend nichtribosomales Material angereichert werden konnte, während der größte Teil des prä-ribosomalen Materials im Überstand verbleibt. Die Ergebnisse aus der Analyse dieser Fraktion legen den Schluß nahe, daß es sich hier um prä-ribosomale RNPs, also um RNP-Strukturen nukleolären Ursprungs handelt (und nicht um cytoplasmatische Kontamination).
Im Nukleolus wird die prä-ribosomale RNA in Form von RNP-Partikeln processiert. Solche RNPs konnten aus HeLa-Zellen (Kumar und Warner, 1972) und Amphibien-Oocyten (Rogers, 1968) isoliert werden: sie enthalten prä-ribosomale RNA und Proteine, die denen cytoplasmatischer Ribosomen ähnlich sind.
Die folgenden Punkte sprechen dafür, daß im RNP-Überstand solche prä-ribosomalen RNPs angereichert sind:
1. Die im RNP-Überstand gefundenen Partikel sedimentieren im Saccharose-Gradienten bei ähnlichen S-Werten wie die cytoplasmatischen Ribosomen.
2. Sie enthalten RNAs, deren Molekulargewichte mit denen prä-ribosomaler RNAs übereinstimmen (1.5×10^6 und 2.6×10^6 Dalton)(Meyer und Hennig, 1974; Lassak, 1975; Meyer, 1975), wobei nur ein sehr geringer Anteil processierter RNA vorhanden ist. Diese RNAs sind, wie alle ribosomalen RNAs, nicht polyadenyliert.
3. Die kleinere RNP-Fraktion (Ü I) enthält die kleine ribosomale RNA (0.7×10^6 Dalton), die möglicherweise eine Vorstufe der cytoplasmatischen 18 S-rRNA darstellt.
4. Die größere RNP-Fraktion (Ü II) enthält überwiegend prä-ribosomale RNAs mit Molekulargewichten von 1.5 und 2.6×10^6 Dalton. Da Ü II

eine heterogene Fraktion darstellt, ist es möglich, daß sich diese beiden RNAs in zwei verschiedenen RNPs befinden, wie es für Amphibien-Oocyten nachgewiesen ist (Rogers, 1968). Diese Fragestellung wurde jedoch hier nicht weiter verfolgt.

5. Ein 2:1-Verhältnis von Ü II und Ü I, wie man es für die beiden ribosomalen Untereinheiten im Cytoplasma findet, tritt hier nicht auf, weil vermutlich die kleine ribosomale Untereinheit sehr viel schneller ins Cytoplasma transportiert wird, wie man es auch bei HeLa-Zellen gefunden hat (Girard et al., 1964; Penman, 1966). Für diese Annahme sprechen auch die Ergebnisse von Meyer (1975): nach nur 3o Minuten Markierungsdauer findet man schon markierte 18 S-rRNA in einem Gesamt-RNA-Extrakt aus larvalen Hodenanlagen von D.hydei, jedoch noch keine fertig processierte 28 S-rRNA, sondern nur ihre Vorstufen.

6. Die Möglichkeit, daß die in Ü II gefundene 1.5×10^6 Dalton-RNA identisch mit der RNA der großen (cytoplasmatischen) ribosomalen Untereinheit (1.4×10^6 Dalton) ist, konnte ausgeschlossen werden: bei Erhitzung (2 Minuten bei 8o ^{o}C) dissoziiert die 28 S-rRNA in zwei Bruchstücke von o.65 und o.75 $\times 10^6$ Dalton (Schwochau et al., 1976), während die nukleäre RNA dieser Größenordnung hitzestabil ist (vergl. Abb. 3 und 4). Es ist anzunehmen, daß erst bei weiterer Reifung dieser RNA ein "nick" im Molekül die Hitzelabilität verursacht.

7. Das Proteinmuster dieser Partikel hat im niedermolekularen Bereich Ähnlichkeit mit dem der cytoplasmatischen Ribosomen, unterscheidet sich von diesem aber durch das Vorhandensein einiger höhermolekularer Proteinfraktionen.

Nach Zentrifugation des Kern-Homogenats erhält man außer dem RNP-Überstand ein RNP-Pellet, in dem sich etwa ein Drittel der in der Gesamtkernfraktion markierten RNA befindet und in dem sich zwei, durch ihr Sedimentationsverhalten im Saccharose-Gradienten unterscheidbare Fraktionen befinden: ein kleinerer Teil sedimentiert unter den gewählten Zentrifugationsbedingungen als RNP im Gradienten (und ist wahrscheinlich nur eine Kontamination des RNP-Überstands), während ca. 64 % der markierten RNA als RNP auf den Boden des Zentrifugenröhrchens pelletieren (=RNP-PP). Dies ist charakterisiert durch einige Eigenschaften, die es von allen anderen hier untersuchten Fraktionen der larvalen Hodenanlagen unterscheidet:

1. Mit einem Sedimentationskoeffizienten von mehr als 9oo S übertrifft es alle bisher in der Literatur beschriebenen Kern-RNPs an Größe (RNPs aus Rattenhirnkernen haben 17o S : Stevenin et al., 1973; RNPs aus Rattenleberkernen haben > 3oo S : Sekeris und Niessing, 1975 und Alonso et al., 1978; RNPs aus Triturus-Oocyten haben 3oo S : Sommerville, 1973; RNPs aus HeLa-Zellkernen haben >2oo S : Ducamp und Jeanteur, 1973), was auf einen hohen Aggregationszustand dieser RNP-Partikel hindeutet. Bestätigt wird diese Annahme durch elektronenmikroskopische Untersuchungen, aus denen sich die Ultrastruktur dieser Partikel ableiten ließ: 2o-3o nm-Subpartikel werden, vermutlich durch RNA, zu perlschnurartigen Komplexen vereinigt, die globuläre Partikel (G-Partikel, 6o-12o nm ø) bilden; diese wiederum aggregieren zu sehr großen RNP-Komplexen (ø > 2oo nm), was weder auf Disulfidbrückenbindung beruht, noch auf eine DNA-Assoziation der RNP-Partikel zurückzuführen ist: DNase-Behandlung des RNP-Pellets ändert nicht das Sedimentationsverhalten oder die Proteinzusammensetzung des RNP-PP (Kloetzel, 1979). Ähnlich strukturierte Partikel können aus Lampenbürstenschleifen-RNPs aus Triturus-Oocyten isoliert werden (Sommerville, 1973; Malcolm und Sommerville, 1974,1977); diese bestehen ebenfalls aus sehr großen Aggregaten (2oo-5oo nm ø), die aus 2o nm-Subpartikeln zusammengesetzt werden und in denen sich vermutlich die an den Schleifen transkribierte RNA befindet.
Entgegen den von Pederson (1974) beschriebenen Ergebnissen , der bei Präparation von RNPs aus Rattenleberzellkernen mit der gleichen Methode eine Anreicherung von Chromatin auf dem Röhrchenboden findet, unterscheidet sich das hier isolierte RNP-PP von Chromatin a) durch das Fehlen chromatin-charakteristischer Proteine, besonders der Histone, was jedoch nicht auf die Verwendung von Heparin zurückzuführen ist (Kloetzel, 1979) und b) durch eine für RNPs charakteristische Struktur im Elektronenmikroskop.

2. Bei einer 24stündigen Markierung mit Uridin kann man aus dem RNP-PP eine RNA-Population heterogener Größe (hnRNA) mit Molekulargewichten zwischen $1o^5$ und > $5 \times 1o^6$ Dalton isolieren, die zu etwa 25 % polyadenyliert ist und somit die Fraktion mit dem höchsten poly(A)$^+$-Gehalt in der gesamten Hodenanlage darstellt

(Cytoplasma: 9 %;RNP-Überstand: 6 %; RNP-Pellet: 14 %; jeweils bezogen auf die innerhalb von 24 Stunden markierte RNA). Der Anteil an präribosomaler RNA ist sehr gering. Verglichen mit dem durchschnittlichen Molekulargewicht der cytoplasmatischen poly(A)$^+$-RNA (4×10^5 Dalton), enthält diese RNP-Fraktion sehr viel höhermolekulare RNA, wie es auch für hnRNA anderer Organismen beschrieben ist(z.B. Levis und Penman, 1977; Daneholt, 1972).

3. Vergleichende Untersuchungen der RNP-PP-RNA zeigen eine ca. dreifache Anreicherung der RNA im X/Y-Genotyp verglichen mit dem X/O-Genotyp, die verbunden ist mit einer ebenso großen Anreicherung der Proteine, wobei besonders starke Unterschiede in einer Proteinfraktion von 66 000 Dalton auftreten, die mit insgesamt 25 % den Hauptproteinanteil dieser Fraktion ausmacht (Kloetzel, 1979). Daraus konnte geschlossen werden, daß diese RNP-Fraktion in Gegenwart der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen angereichert wird. Dabei genügt nicht allein die Existenz des Y-Chromosoms, sondern ausschlaggebend ist die Ausfaltung der Lampenbürstenschleifen. Diese vermehrte RNA-Synthese im Wildtyp läßt sich nicht mit einer geringeren Synthese-Aktivität der Mutante begründen: bezogen auf das $^{14}C/^{3}H$-Verhältnis des Cytoplasmas findet man im RNP-PP eine Verdreifachung dieses Wertes, d.h., es findet eine relative Anreicherung von X/Y-RNA im Vergleich zu anderen Fraktionen statt.
Das Fehlen eines qualitativen Unterschieds in der RNA dieser Fraktion aus X/Y- und X/O-Hodenanlagen führte zu dem Schluß, daß die Masse dieser RNA nicht vom Y-Chromosom codiert sein kann, sondern auf den Autosomen und dem X-Chromosom transkribiert wird.

4. Die Gegenwart der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen ist somit verantwortlich für eine Anreicherung von hnRNPs im Zellkern der primären Spermatocyte, die als RNP-PP isoliert werden können. Fehlen die Schleifen, (so im X/O-Genotyp), so beobachtet man ein starkes Abfallen der $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurve im niedermolekularen Bereich zugunsten von X/O (vergl. Abb. 18a), wofür es zwei Interpretationsmöglichkeiten gibt: a) Die Regulation findet schon auf der Transkriptionsebene statt: bei fehlenden Y-Lampenbürstenschleifen wird von Anfang an weniger hochmolekulare RNA an den Autosomen synthetisiert,oder b) ein post-transkriptioneller Regulations-

mechanismus verhindert eine schnelle Degradation der hnRNA in Gegenwart der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen. Da im Cytoplasma eine gerader Verlauf der $^{14}C/^{3}H$-Verhältniskurve gefunden wird, scheint die durch die Lampenbürstenschleifen regulierte Akkumulation der RNA auf den Kern begrenzt zu sein.

5. Etwa o.6 % der im RNP-PP vorhandenen hnRNA ist RNase-resistent, wobei zwei Größenklassen von 8o-12o bzw. 2oo-3oo Nukleotiden auftreten. Hierfür kann es mehrere Ursachen geben: a) es handelt sich um poly(A)-Sequenzen. Diese Möglichkeit kann bei Markierung mit Uridin ausgeschlossen werden. b) Es liegen doppelsträngige Fragmente vor, deren Existenz u.a. in der hnRNA von HeLa-Zellen nachgewiesen ist (Jelinek, 1974) und für die hnRNA der Lampenbürstenschleifen-RNPs aus Triturus-Oocyten diskutiert wird (Malcolm und Sommerville, 1977). Auch diese Möglichkeit scheidet für den größten Teil dieser Fragmente aus, da eine RNase-Behandlung der deproteinisierten RNA zur Hydrolyse nahezu aller RNA-Sequenzen führt (vergl. Abb.2o a,b). Es bleibt also die Möglichkeit c), daß es sich hier um proteingeschützte Sequenzen handelt. Als solches "Schutzprotein" kommt das 66 ooo Dalton-Protein in Frage, das im RNP-PP auch nach RNase-Behandlung angereichert ist (Kloetzel, 1979). Die Existenz von Protein-geschützten, RNase-resistenten Sequenzen in RNP-Partikeln ist sowohl für Kern-RNPs beschrieben worden (Augenlicht, 1978), in denen RNase-resistente Fragmente von 26 Nukleotiden gefunden worden sind, als auch für den 15 S-Globin-mRNP-Komplex aus Polysomen von Entenreticulocyten (Goldenberg et al., 1979); dort besitzt die Globin-mRNA Nuclease-resistente Sequenzen mit einer Länge von 35 und 7o Nukleotiden.

Da die gleichen RNase-stabilen Fragment-Klassen sowohl in X/Y- als auch in X/O- Hodenanlagen auftreten, läßt dies eine ähnliche Struktur der RNPs in beiden Genotypen vermuten: dabei sind lange RNA-Moleküle so mit Proteinen assoziiert, daß ca. o.6 % dieser RNA gegen RNase-Wirkung geschützt sind. Auf Grund der geringen Größe dieser RNA-Fragmente ist es unwahrscheinlich, daß es sich um codierende Sequenzen innerhalb der hnRNA handelt. Vielmehr könnten es spezifische Proteinerkennungssequenzen sein, die für eine feste RNA-Protein-Bindung sorgen. Durch Reassoziierungen

konnte eine spezifische Bindung zwischen der poly(A)$^+$-RNA des RNP-PP und dem 66 000 Dalton-Protein nachgewiesen werden, die für die RNAs aus anderen Fraktionen (RNP-Überstand, Cytoplasma) nicht, bzw. nur in sehr geringem Maße existiert und die nicht poly(A)-spezifisch ist (Kloetzel, pers.Mitt.).

6. Durch in-situ Hybridisierungen mit radioaktiv-markierter cDNA sollte geklärt werden, ob die in Gegenwart der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen akkumulierte RNP-PP-RNA Bestandteil der Schleifenmatrix ist. Hybridisierung von DNA an chromosomale RNA wurde erstmals von Pukkila (1975) beschrieben, die markierte 5 S-DNA an nascierende 5 S-RNA-Transkripte in Oocyten-Lampenbürstenschleifen hybridisierte. Später wurde die gleiche Methode erfolgreich von anderen Autoren zur Lokalisation von transkriptionsaktiven Orten am Chromosom verwendet (Old und Callan, 1977 für die Lokalisation der Histon-mRNA-Gene; Livak et al., 1978 für die Lokalisation der Hitzeschock-mRNA-Gene).
Bei Hybridisierung mit RNP-PP-cDNA findet man signifikante Markierungen über den Spermatocytenkernen, die im Bereich der proximalen Schleifen gehäuft auftreten, jedoch keine eindeutige Korrelation zu einzelnen Lampenbürstenschleifen zulassen.
Folgende Punkte müssen bei der Deutung der hier durchgeführten Hybridisierungen berücksichtigt werden:
a) Es könnte sein, daß die Hybridisierungsbedingungen für die 38 S-cDNA, mit der die Methode getestet wurde, und die für die RNP-PP-cDNA nicht vergleichbar sind, z.B. dann, wenn die in der Lampenbürstenschleifenmatrix vorliegende RNA einer bestimmten Sequenz weniger häufig vertreten ist als die rRNA im Nukleolus. Ebenso könnte die Konzentration an cDNA für eine bestimmte hnRNA-Sequenz niedriger sein als die Konzentration der 38 S-cDNA.
b) Es ist möglich, daß die Packungsdichte der RNPs in der Lampenbürstenschleifenmatrix sehr viel größer ist als die im Nukleolus, so daß die darin enthaltene RNA unter den hier gewählten Bedingungen nicht, bzw. nur begrenzt zugängig für die cDNA ist. Eine solche Möglichkeit wurde schon von Pukkila (1975) für die Lampenbürstenschleifen der Triturus-Oocyten diskutiert: während die mit der 5 S-RNA assoziierten Proteine eine in-situ Hybridisierung nicht verhindern,

könnten mRNAs so mit Proteinen verpackt sein, daß sie unzugängig für eine Hybridisierung mit der cDNA werden.
c) Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die in den Lampenbürstenschleifen enthaltene RNA hauptsächlich komplementäre Sequenzen zur poly(A)$^-$-RNP-PP-RNA besitzt, die ca. 75 % der RNP-PP-RNA ausmacht. Da sich diese RNA mit nur sehr geringer Effizienz revers transkribieren läßt, konnte ihre cDNA nicht für in-situ Hybridisierungen eingesetzt werden.
d) Es ist denkbar, daß die Schleifenmatrix nicht nur auf die im Lichtmikroskop erkennbaren Strukturen begrenzt ist, sondern darüber hinaus sich über weitere Bereiche des Zellkerns erstreckt, die, z.B. auf Grund anderer Packungsdichten, lichtmikroskopisch nicht sichtbar sind.

7. Filterhybridisierungsexperimente mit RNP-PP-RNA machen deutlich, daß die Menge der hybridisierten RNA proportional zur Menge an Y-DNA auf dem Filter ist, d.h., daß diese RNA vermehrt an Y-chromosomale DNA-Sequenzen hybridisiert. Auch Hennig (1968) und Schwochau (pers.Mitt.) finden bei Verwendung von Gesamthoden-RNA eine vermehrte Hybridisierung in Gegenwart von Y-DNA, woraus sie auf die Existenz von Y-Transkripten schlossen.
Hier konnte jedoch gezeigt werden, daß auch die RNP-PP-RNA aus X/O-Hodenanlagen, die nur Transkripte der Autosomen und des X-Chromosoms enthalten kann, komplementäre Sequenzen zur Y-DNA besitzt und, genau wie die X/Y-RNP-PP-RNA, proportional zur Menge der Y-chromosomalen DNA auf dem Filter hybridisiert. Dabei kann eine Kontamination dieser X/O-RNP-PP-RNA mit X/Y-RNA ausgeschlossen werden, da durch cytologische Kontrolle der X/O-Zustand der Hodenanlagen ständig überprüft wurde.
Ferner kann es sich nicht um die Hybridisierung von rRNA, (die in sehr geringen Mengen im RNP-PP vorhanden ist), handeln, da der rDNA-Gehalt der verwendeten Genotypen eine solche Hybridisierung nicht erklären kann: X/X besitzt 669 Cistrons/2n, X/Y 542 Cistrons/2n und die Männchen mit zwei Y-Chromosomen haben 831 Cistrons/2n (Franz, 1979).
Da es sich bei der hier verwendeten RNA um ein Gemisch verschiedener RNA-Sequenzen handelt, die in unterschiedlichen, nicht bekannten

Konzentrationen vorliegen, kann man, weil keine Angaben für den Sättigungsbereich ermittelt wurden, keine Aussagen über die Repetitivität der komplementären DNA-Sequenzen machen.
Es ist jedoch anzunehmen, daß eine Hybridisierung der RNP-PP-RNA an repetitiven Sequenzen des Y-Chromosoms stattfindet. Die Existenz von mittelrepetitiven Sequenzen auf dem Y-Chromosom von D.hydei wurde von Hennig (1973) und Renkawitz (1978) beschrieben; Hennig nimmt an, daß sich gleiche oder ähnliche Sequenzen auf den verschiedenen Lampenbürstenschleifen befinden.
Die aus dem RNP-PP isolierte RNA muß aber gleichzeitig komplementäre Sequenzen auf der DNA der Autosomen bzw. des X-Chromosoms besitzen und dort transkribiert werden, weil sie auch aus X/O-Spermatocytenkernen gewonnen werden kann. Weiterführende Ergebnisse aus in-situ Hybridisierungen mit ^{3}H-markierter DNA aus Männchen, in der die autosomalen und X-chromosomalen Sequenzen durch einen Überschuß an kalter Weibchen-DNA kompetiert wurden, bestätigen diese Annahmen: nichtkompetierte Y-DNA-Sequenzen hybridisieren sowohl an die RNA der Autosomen als auch an die RNA der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen (Schwochau, Nellen, Knust, unveröffentlicht). Das bedeutet: 1) Diese Sequenzen müssen auf dem Y-Chromosom in größerer Zahl vorhanden sein als auf den Autosomen. 2) Gleiche Sequenzen müssen sich auch auf den Autosomen befinden und dort transkribiert werden und 3) diese Transkripte werden in den Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms akkumuliert (oder auch dort hergestellt).
Zur Erkärung dieser Ergebnisse sind zwei Modellvorstellungen denkbar:
1. Die auf dem Y-Chromosom vorhandenen Sequenzen sind identisch mit codierenden Sequenzen auf den Autosomen und dem X-Chromosom und stellen eine Vervielfältigung bestimmter, für die Spermiogenese notwendiger Informationen dar, die dann im Stadium der primären Spermatocyte vermehrt transkribiert werden können.
2. Die Sequenzen des Y-Chromosoms, die mit der RNP-PP-RNA hybridisieren, stellen "Regulator-Gene" dar, die in mehrfacher Ausführung auf dem Y-Chromosom vorhanden sind. Diese "Regulator-Gene" könnten direkt oder über eine "Regulator-RNA", die von diesen transkribiert wird, für eine Akkumulation bestimmter RNPs sorgen. Die zu speichernden RNAs in diesen RNPs wären dann charakterisiert durch den Besitz einer Sequenz, die komplementär zu der der "Regulator-Sequenz" des Y-Chromosoms ist.

Den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen käme damit die Funktion zu, für eine Speicherung der im Stadium der primären Spermatocyte synthetisierten hnRNA zu sorgen, damit die RNA, die im Verlauf der Spermiendifferenzierung transliert wird, über die meiotischen Teilungen erhalten bleibt.

Mit diesem Modell lassen sich hier aufgeführte Ergebnisse und früher beschriebene cytogenetische Befunde deuten:

a) Fehlen die Lampenbürstenschleifen, so werden zwar alle RNAs synthetisiert und sie besitzen auch eine zum "Regulator-Gen" komplementäre Sequenz, aber sie können nicht gespeichert werden und werden vorzeitig abgebaut . (s.Abb.18)

b) Defizienz des ganzen Y-Chromosoms oder einzelner Schleifenbildungsorte führt zu einer fehlerhaften Spermiogenese; dabei ist die Koordination der Zelle gestört, es sind aber, wenigstens in einzelnen Spermatiden, alle Spermienorganellen (Nebenkernderivat, Flagellum, Acrosom) vorhanden (Hess, 1968; Hess und Meyer, 1968; Meyer, 1968). Es ist denkbar, daß auf Grund fehlender oder zu weniger "Regulator-Gene" nicht genügend RNP-Material gespeichert werden kann und bei der Verteilung auf die Spermatiden die Zellen nicht ausreichend mit postmeiotisch benötigter RNA versorgt werden. Es müssen aber einige qualitative Unterschiede zwischen den einzelnen Schleifen vorhanden sein, da z.B. das Fehlen der Tubuli, Keulen und Schlingen nicht durch Verdopplung der Fäden und des Pseudonukleolus kompensiert werden kann.

c) Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Y-Schleifen und der Länge der Spermatiden bzw. Spermien: Tiere mit Y-Defizienzen besitzen Spermatiden mit geringerer Länge als Wildtyp-Männchen, während solche mit zwei Y-Chromosomen etwa doppelt so lange Spermien besitzen wie der Wildtyp (Hess, 1971). Das kann dadurch erklärt werden, daß eine Verdopplung der Lampenbürstenschleifen gleichzeitig zu einer Verdopplung der "Regulator-Gene" führt und deshalb mehr RNA gespeichert werden kann als zum Aufbau normal langer Spermien benötigt wird.

Die hier beschriebenen Daten und das daraus entworfene Modell stellen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Funktion der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen von Drosophila hydei dar.

V. Zusammenfassung

Die Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms sind charakteristische Strukturen der primären Spermatocyten von Drosophila hydei , die an der Regulation der Spermiogenese beteiligt sind.
Zur Isolierung und Charakterisierung dieser Strukturen wurde eine Methode zur Massenisolation von Spermatocytenkernen aus larvalen Hodenanlagen entwickelt. Durch differentielle Zentrifugation und Auftrennung in Saccharose-Gradienten konnten daraus mehrere RNP-Fraktionen gewonnen werden, von denen der größte Teil präribosomale RNPs darstellt, deren Sedimentationskoeffizienten, RNA- und Proteinzusammensetzung untersucht wurden.

Ferner konnte eine RNP-Fraktion (= RNP-PP) isoliert werden, die im X/Y-Genotyp etwa dreifach im Vergleich zu der gleichen Fraktion aus dem X/O-Genotyp angereichert ist. Der Sedimentationskoeffizient von mehr als 9oo S läßt auf einen sehr hohen Aggregationszustand schließen, was auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt wurde.

Die RNA dieser RNP-Fraktion besitzt eine heterogene Molekulargewichtsverteilung im Bereich von 5×10^5 Dalton bis über 4×10^6 Dalton; 25 % dieser RNA sind polyadenyliert.

RNase T_1-Behandlung des RNP-Pellets zeigt, daß etwa o.6 % der RNP-PP-RNA durch Assoziation mit spezifischen Proteinen RNase-stabil ist, wobei RNase-resistente Fragmente in zwei Größenklassen von 8o-12o und 2oo-3oo Nukleotiden isoliert werden können.

Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß in Anwesenheit der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen hochmolekulare RNA vermehrt im X/Y-Genotyp zu finden ist. Qualitative Unterschiede in definierten RNA-Klassen in der RNP-PP-RNA aus X/Y- und X/O-Spermatocytenkernen konnten nicht nachgewiesen werden.

In-situ Hybridisierungen mit radioaktiv-markierter cDNA an die RNA der Spermatocytenkerne lassen eine Anhäufung der RNP-PP-RNA im Bereich der proximalen Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms vermuten.

Durch Filterhybridisierungsexperimente konnte gezeigt werden, daß die RNP-PP-RNA sowohl aus X/Y- als auch aus X/O-Spermatocytenkernen komplementäre Sequenzen auf der Y-chromosomalen DNA besitzt und dort vermehrt hybridisiert.
Die Daten zeigen, daß die RNA des RNP-PP autosomal und/oder X-chromosomal codiert ist und in Gegenwart der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen angereichert wird.
An Hand der Ergebnisse wird ein Modell diskutiert, das an den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen eine Akkumulation autosomaler RNA vorschlägt, die für eine geregelte Spermiogenese notwendig ist.

VI. Literaturverzeichnis

Alonso, A., Ch. Louis, C.N. Flytzanis und C.E. Sekeris (1978) Distribution of coding sequences within the nuclear hnRNA-protein comlexes. FEBS Letters 93 , 351-356

Augenlicht, L.H. (1978) Staphylococcal nuclease digestion of relatively stable RNA in the chromatin and nuclear ribonuclearprotein fractions of human carcinoma cells. The Journal of Biological Chemistry 253 , 3o35-3o41

Beck, H. (1976) New compound (1) chromosomes and the production of large quantities of X/O males in Drosophila hydei . Gent.Res., Camb. 26 , 313-317

Bergmeyer, H.U. (197o) Methoden der enzymatischen Analysen. Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstraße, 446, 575

Boshes, R.A. (197o) Drosophila polyribosomes : The characterization of two populations by cell fractionation and isotopic labeling with nucleic acid and protein precursors. The Journal of Cell Biology 46 , 477-49o

Boyd, J.B. , H.D.Berendes, H.Boyd (1968) Mass preparation of nuclei from the larval salivary glands of Drosophila hydei. The Journal of Cell Biology 38 , 369

Callan, H.G. (1963) The nature of lampbrush chromosomes. Int.Rev.Cytol. 15 , 1-34

Daneholt, B. (1972) Giant RNA transcripts in a Balbiani ring Nature New Biol. 24o , 229-232

Denhardt, D.T. (1966) A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem.Biophys.Res.Comm. 29 , 641-646

Ducamp, C. und P. Jeanteur (1973) Characterization of nuclear RNP particles from HeLa cells. Analysis of protein and RNA constituents. Presence of poly(A). Biochimie 55 , 1235-1243

Edström, J.E. und B.Daneholt (1967) Sedimentation properties of the newly synthesized RNA from isolated nuclear components of Chironomus tentans salivary gland cells. J.Mol.Biol. 28 , 331

Franz, G. (1979) Zahl der rRNA-Gene bei Drosophila hydei-Stämmen mit einem Überschuß an Y-chromosomalen und einem Defizit an X-chromosomalen Nukleolenorganisatoren. Diplomarbeit, Math.Nat.Fakultät, Universität Düsseldorf

Gall, J.G. und H.G.Callan (1962) ^{3}H-uridine incorporation in lampbrush chromosomes. Proc.Natl.Sci.Acad. USA 48 , 562-57o

Gillespie, D. und S.Spiegelman (1965) A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. J.Mol.Biol. 12 , 829-842

Girard,M., S.Penman, J.E.Darnell (1964) The effect of actinomycin on ribosome formation in HeLa cells. Proc.Natl.Sci.Acad. USA 51, 2o5

Goldenberg, S., A.Vincent und K.Scherrer (1979) Evidence for the protection of specific RNA sequences in globin messenger ribonucleoprotein particles. Nucleic Acids Res.6 , 2787-2797

Glisin, V., R.Crkvenjakov und C.Byus (1974) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochemistry 13 ,2633-2637

Hennen, S., S.Mizuno und H.C.Macgregor (1975) In-situ hybridization of ribosomal DNA labelled with ^{125}iodine to metaphase and lampbrush chromosomes from newts. Chromosoma (Berl.) 5o , 349-369

Hennig, W. (1967) Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Lampenbürsten-Y-Chromosoms in der Spermatogenese von Drosophila . Chromosoma (Berl.) 22 , 294-357

Hennig, W. (1968) Ribonucleic acid synthesis of the Y-chromosome of Drosophila hydei . J.Mol.Biol. 38 , 227-239

Hennig, W., O.Leoncini, I.Hennig (1973) Heterochromatin, simple sequence DNA and differential staining patterns in Drosophila chromosomes. In: Pfeiffer, R.A. (ed.), Modern Aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man. Schattauer, Stuttgart und New York, 87-99

Hennig, W., G.F.Meyer, I.Hennig und O.Leoncini (1974) Structure and function of the Y-chromosome of Drosophila hydei . Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 38 , 273-283

Hess, O. (1965) Strukturdifferenzierungen im Y-Chromosom von Drosophila hydei und ihre Beziehungen zu Gen-Aktivitäten. III. Sequenz und Lokalisation der Schleifenbildungsorte. Chromosoma (Berl.) 16 , 222-248

Hess, O. (1968) The function of the lampbrush loops formed by the Y-chromosome of Drosophila hydei in spermatocyte nuclei. Molec.Gen.Genet. 103 , 58-71

Hess, O. (1971) Lampenbürstenchromosomen. In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York,215-281

Hess, O. (1976) Genetics of Drosophila hydei Sturtevant. In: E.Novitzki and M.Ashburner (ed.) " The Genetics and Biology of Drosophila" 1c , 1343-1363

Hess, O. und G.F.Meyer (1963) Chromosomal differentiations of the lampbrush type formed by the Y-chromosome in Drosophila hydei and D.neohydei. J.Cell Biol. 16 , 527-539

Hess, O. und G.F.Meyer (1968) Genetic activities of the Y-chromosome in Drosophila during spermatogenesis. Advan.Genet. 14 , 171-223

Jelinek, W., Molloy,G., Fernandez-Munoz,R., Saditt,M. and Darnell,J.E. (1974) Secondary structure of heterogeneous nuclear RNA: involvement of regions from repeated DNA sites. J.Mol.Biol. 82, 361-37o

Kloetzel, P.-M. (1979) Molekulare Untersuchung der Proteine in frühen Spermatogenesestadien von Drosophila hydei und deren Beziehung zu den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen. Dissertation, Math.Nat.Fakultät, Universität Düsseldorf

Knust, E. (1975) Versuche zur Isolierung von Ribonukleoprotein-Partikeln aus primären Spermatocytenkernen von Drosophila hydei . Diplomarbeit, Math.Nat.Fakultät, Universität Düsseldorf

Kumar, A. und J.R.Warner (1972) Characterization of ribosomal precursor particles from HeLa cell nucleoli. J.Mol.Biol. 63 , 233-246

Lassak, H.-F. (1975) Die Wirkung von α-Amanitin auf die RNA-Synthese in larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei . Diplomarbeit, Math.Nat.Fakultät, Universität Düsseldorf

Lassak, H.-F., P.-M.Kloetzel, M.Schwochau, K.H.Glätzer (1979) RNA-synthesis,RNA storage and translational products in the spermatogenesis of Drosophila hydei.Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem.360,314

Levis, R. und S.Penman (1977) The metabolism of poly(A)$^+$- and poly(A)$^-$-hnRNA in cultured Drosophila cells studied with a rapid uridine pulse-chase. Cell 11 , 1o5-113

Livak, K.J., R.Freund, M.Schweber, P.C.Wensink und M.Meselson (1978) Sequence organization and transcription at two heat shock loci in Drosophila . Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75 ,5612-5617

Malcolm, D.B. und J.Sommerville (1974) The structure of chromosome-derived ribonucleoprotein in oocytes of Triturus cristatus carnif (Laurent). Chromosoma (Berl.) 48 , 137-158

Malcolm, D.B. und J.Sommerville (1977) The structure of nuclear ribonucleoprotein of amphibian oocytes. J.Cell Sci. 24 ,143-165

McEwen, C.R. (1967) Tables for estimating sedimentation through linear concentration gradients of sucrose solution. Anal.Biochem. 2o , 114-149

Mead, C.D. (1964) A deoxyribonucleic acid-associated ribonucleic acid from Drosophila melanogaster . J.Biol.Chem. 239, 55o-554

Meyer, G.F. (1963) Die Funktionsstrukturen des Y-Chromosoms in den Spermatocytenkernen von Drosophila hydei, D. neohydei , D. repleta und einigen anderen Drosophila-Arten. Chromosoma (Berl.) 14 , 2o7-255

Meyer, G.F. (1968) Spermiogenese in normalen und Y-defizienten Männchen von Drosophila melanogaster und D. hydei . Z.Zellforschung 84 , 141-175

Meyer, G.F. und W.Hennig (1974) The nucleolus in primary spermatocytes of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl.)46,121-144

Meyer, G.F. und O.Hess (1965) Strukturdifferenzierungen im Y-Chromosom von Drosophila hydei und ihre Beziehungen zu Genaktivitäten. II. Effekt der RNS-Synthese-Hemmung durch Actinomycin. Chromosoma (Berl.) 16 , 249-27o

Meyer, M. (1975) Synthese und "processing" der ribosomalen RNA in larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei . Diplomarbeit, Math.Nat.Fakultät, Universität Düsseldorf

Mirault, M.-E. und K.Scherrer (1971) Isolation of preribosomes from HeLa cells and their characterization by electrophoresis on uniform and exponential-gradient-polyacrylamide gels. Eur.J.Biochem. 23 , 372-386

Mulder, M.P., P. van Duijn und H.J.Gloor (1968) The replicative organization of DNA in polytene chromosomes of Drosophila hydei . Genetica 39 , 385-428

Nellen, W. (1975) Die Wirkung von Actinomycin D auf die RNA-Synthese in larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei . Diplomarbeit, Math.Nat.Fakultät, Universität Düsseldorf

Old, R.W., H.G.Callan und K.W.Gross (1977) Localization of histone gene transcripts in newt lampbrush chromosomes by in-situ hybridization . J.Cell Sci. 27 , 57-79

Olivieri, G. und A.Olivieri (1965) Autoradiographic studies of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in Drosophila melanogaster . Mutation Res. 2 , 366-371

Pardue, M.-L. und J.G.Gall (1975) Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. Meth.Cell Biol. 1o ,1-16

Pederson, T. (1974) Gene activation in eukaryotes: Are nuclear acidic proteins the cause or the effect. Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 71 , 617-621

Penman, S. (1966) RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. J.Mol.Biol. 17 , 117-13o

Perry, R.P., T.-Y.Cheng, J.J.Freed, J.R.Greenberg, D.E.Kelley und K.D.Tartof (197o) Evolution of the transcription unit of ribosomal RNA. Proc.Natl.Acad.Sci. 65 , 6o9-616

Pukkila, P.J. (1975) Identification of the lampbrush chromosome loops which transcribe 5 S ribosomal RNA in Notophthalmus (Triturus) viridescens . Chromosoma (Berl.) 53 , 71-89

Renkawitz, R. (1978) Characterization of two moderately repetitive DNA components localized within the B-heterochromatin of Drosophila hydei . Chromosoma (Berl.) 66 , 225-236

Rogers, M.E. (1968) Ribonucleoprotein particles in the amphibian oocyte nuclei. J.Cell Biol. 36 , 421-432

Rosen, J.M. (1976) Quantitation of casein mRNA sequences using a specific complementary DNA hybridization probe. Biochemistry 15 , 5272

Schäfer, U. Analysis of two heterosome-autosome translocations in D.hydei. DIS 53, 12o (1978)

Schneider, I. (1966) Differentiation of larval Drosophila eye-antennal discs in vitro. J.Exptl.Zool. 156 , 91-1o4

Schwochau, M., D.Mischke und P.Kloetzel (1976) Final steps in maturation and the molecular structure of insect large ribosomal RNA. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 357 , 336

Sekeris, C.E. und J.Niessing (1975) Evidence for the existence of a structural RNA component in the nuclear RNP-particles containing heterogeneous RNA. Biochem.Biophys.Res.Comm.62, 642-65o

Sommerville, J. (1973) Ribonucleoprotein particles derived from the lampbrush chromosomes of newt oocytes. J.Mol.Biol.78,487-5o3

Sommerville, J. (1977) Gene activity in the lampbrush chromosomes of amphibian oocytes. Int.Rev.Biochem. Biochemistry of Cell Differentiation II, Vol.15, 79-155

Sommerville, J. und D.B.Malcolm (1976) Transcription of genetic information in amphibian oocytes. Chromosoma (Berl.) 55 , 183-2o8

Spohr, G., M.-E.Mirault, T.Imaizumi und K.Scherrer (1976) Molecular-weight determination of animal-cell RNA by electrophoresis in formamide under fully denaturing conditions on exponential polyacrylamide gels.Eur.J.Biochem. 62 , 313-322

Steffenson, D.M. (1973) Mapping genes for the ribosomal protein of Drosophila . Nature New Biol. 244 , 231-234

Stévenin, J., R.Zawislak und M.Jacob (1973) Etude de l'action de sels de cations monovalents sur les particules ribonucléoprotéiques de cerveau de rat.Eur.J.Biochem. 33 , 241-246

Zielke, U. (1978) Versuche zur Isolierung und Charakterisierung der Mitochondrien von Drosophila hydei . Schriftliche Hausarbeit in Biologie, Künstlerisch/Wissenschaftliches Prüfungsamt, Universität Düsseldorf.

VII. Anmerkungen

Herrn Professor Dr.M.Schwochau danke ich für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Professor Dr.O.Hess danke ich für das Interesse und die Unterstützung meiner Arbeit.
Für viele anregende Diskussionen bin ich Herrn Dr. P.-M.Kloetzel, Herrn W.Nellen,Herrn H.-F.Lassak und Herrn Dr.D.Mischke zu besonderem Dank verpflichtet, die mir auch, ebenso wie Frau U.Zielke und Frau B.Grunert, bei der Materialbeschaffung behilflich waren.
Frau C.Mischke, Frau P.Ritter und Frau M.Brand gilt mein Dank für das Sammeln der Fliegen.
Herrn Dr.K.H.Glätzer und Herrn Dr.J.Sommerville danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.
Für zahlreiche Hinweise bei der Durchführung cytologischer Arbeiten danke ich Herrn Dr.K.H.Glätzer.
Für die Überlassung der Reversen Transkriptase bin ich Herrn Dr.J.W.Beard zu Dank verpflichtet.
Die Arbeit wurde durch Mittel unterstützt, die Herrn Professor Dr.M.Schwochau von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt wurden (Schw 17o/5).

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

E. Knust und P.-M.Kloetzel : Isolation and characterization of ribonucleoprotein particles from nuclei of the primary spermatocytes of Drosophila hydei.
Abstracts, 12th FEBS Meeting, Dresden 1978

P.-M.Kloetzel, E. Knust, M. Schwochau : Characterization of proteins accumulating in the nuclei of primary spermatocytes of Drosophila hydei in correlation to the unfolding of the Y-chromosomal lampbrush loops.
Abstracts, 12th FEBS Meeting, Dresden 1978

E. Knust, P.-M.Kloetzel, M. Schwochau : Isolation and characterization of ribonucleoprotein particles from nuclei of the primary spermatocytes of Drosophila hydei.
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 360, 305 (1979)

VIII. Lebenslauf

Name:	Elisabeth Knust
Geburtsort und Datum:	9.1.1951 in Leverkusen
Eltern:	Dr. Ernst Knust, Chemiker Renate Wolffram
Wohnsitz:	Düsseldorf, Flügelstr. 44
Schulbesuch:	1957–1959 Gemeinschaftsschule Leverkusen 1959–1961 Evangelische Volksschule in Bergisch-Neukirchen 1961–1969 Ina-Seidel-Gymnasium in Opladen Abitur im Juni 1969
Universitätsausbildung:	seit WS 1969/7o Studium der Biologie an der Universität Düsseldorf Oktober 1971 Vordiplom Oktober 1975 Diplom mit Hauptfach Genetik Die Diplomarbeit wurde im Institut für Allgemeine Biologie angefertigt. seit WS 1975/76 Anfertigung der Dissertation
Praktische Tätigkeiten:	1972–1977 studentische bzw. wissenschaftliche Hilfskraft, zuerst im Institut für Zoologie und dann im Institut für Allgemeine Biologie 1975–1977 nebenberufliche Lehrkraft am Lise-Meitner-Gymnasium,Düsseldorf 1977–1979 Unterricht im Fach Biologie an der Staatlichen Lehranstalt für Medizinisch-Technische Assistentinnen in Düsseldorf seit Januar 1978 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof.Dr.M.Schwochau, finanziert durch die DFG.

Elisabeth Knust